Vol. 28, No. 3 November, 1938

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Sendai; TOYOO UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,

11 Itchome Kagacho, Ushigome.

Price: $5.50 per volume.

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

ÜBER DIE PEPTONKÖRPER DER GELATINE.

II. Mitteilung. Die fraktionierten Erepsindigestate des Peptons und des Tryptons.

Von

TOSHIO MORI.

(*Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Fakultät Nagasaki. Direktor: Prof. Dr. Senji Utzino.*)

(Eingegangen am 19. Mai 1938)

Im Anschluss an die vorige Arbeit habe ich hier weiter die beiden Peptonkörper—Pepsinpepton und Trypsintrypton—der wiederholten Digestion mit Darmerepsin (Dünndarmschleimhaut des Schweines) unterworfen, das erneut je 4 Tage nach der Enzymwirkung dem Versuchsansatz zugesetzt wurde. Die Abbauprodukte dieser drei fraktionierten Erepsindigestate wurden als Niederschlag durch eine genügende Menge Phosphorwolframsäure und als Filtrat dieses Niederschlags beobachtet. Die Beobachtungen beziehen sich in der Hauptsache auf den durch Arginase angreifbaren Argininstickstoff sowie den befreiten Aminostickstoff des Phosphorwolframsäureniederschlags der drei Fraktionen.

Die Ergebnisse sind in der zusammenfassenden Tabelle I angegeben. Nach der dritten Digestion war die Zunahme des Aminostickstoffs in der Digestionslösung der beiden Körper minimal geworden (Tabelle II). Die verhältnismässig schwächere Zunahme des Aminostickstoffs in der ersten Tryptondigestion kann man wohl daraus erklären, dass die Peptidkette der Gelatine schon bei der Trypsinverdauung stärker als bei der Pepsindigestion hydrolysiert wurde und dass man das Trypton als eine niedrigere Abbaustufe als das Pepton vor sich hat, wie ich schon in der ersten Mitteilung dieser Arbeit dargelegt habe. Hier sei auch erwähnt, dass trotz grösserer Zunahme des Aminostickstoffs im ersten Erepsindigestat des Peptons das Abbauprodukt fast restlos durch Phosphorwolframsäure gefällt wurde, während schon eine kleine

TABELLE I.

Zusammenfassende Ergebnisse der Erepsinhydrolysate des Peptons und des Tryptons der Gelatine durch fraktionierte Digestion.

Substrate	Erepsinhydrolysat der fraktionierten Digestion des Peptons			Erepsinhydrolysat der fraktionierten Digestion des Tryptons		
	I Niederschlag 1	II Niederschlag 2	III Niederschlag 3	I Niederschlag 1	II Niederschlag 2	III Niederschlag 3
Gesamt-N (%)	13,81	14,35	14,86	13,85	12,74	16,25
Amino-N (%)	4,41	4,75	7,72	4,04	5,22	9,73
Amino-N/Gesamt-N	31,93	32,10	51,95	29,17	40,97	59,88
Durch Arginase spaltbarer Arginin-N in Totalhydrolysat (%)	2,18	2,18	2,09	2,37	2,37	2,67
Spaltbarer Hydrolysatarginin-N/Gesamt-N	15,79	15,19	14,06	17,11	18,60	16,43
Durch Arginase spaltbarer Arginin-N in Niederschlag (%)	1,78	2,03	2,17	2,07	2,22	2,57
Spaltbarer Arginin-N /Gesamt-N	12,89	14,15	14.60	14,95	17,43	15,82
Spaltbarer Arginin-N /Spaltbarer Hydrolysatarginin-N	81,65	93,12	103,83	87,34	93,67	96,25

Menge Abbauprodukt im Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung vom ersten Tryptondigestat herstammt (Versuch 1 u. 3).

Mit dem Fortschreiten der Digestion durch erneuten Erepsinzusatz nahm der Aminostickstoff im Fraktionsniederschlag immer mehr zu und betrug schliesslich mehr als 50% des Gesamtstickstoffs. Die Zunahme des freien Aminostickstoffs des Niederschlags 2 u. 3 der beiden entsprechenden Digestionen des Tryptons war immer grösser als die des Peptons. Zu erwähnen ist, dass der Gesamtstickstoff des Niederschlags 2 der zweiten Digestion des Tryptons ca. 13% und der des Niederschlag 3 ca. 16% betrug, während derjenige der drei Digestionen des Peptons fast gleiche Werte zeigte. Der letzte Digestionsniederschlag des Peptons oder des Tryptons war nicht mehr durch Tannin fällbar und die Biuretreaktion desselben fiel ganz oder fast ganz negativ aus (Tabelle III u. VII). Es ist hier als sehr interessant hervorzuheben, dass der durch Arginase angreifbare Argininstickstoff des Niederschlags 2 der zweiten Digestion der beiden Körper mehr als 90% des durch Arginase gespaltenen Gesamtargininstickstoffs betrug und der letzte Niederschlag 3 fast 100%. Wenn man annehmen sollte, dass die Arginasewirkung nur auf das freie Arginin eingestellt sei, dürfte man also auf eine sehr rasche Abspaltung des Arginins der Peptonkörper (90%) durch Erepsinwirkung schliessen. Man möchte aber hier auch eine Arginasewirkung auf Peptidarginin oder Komplexarginin annehmen, wie M. Kaiju (1938) eine gewisse, wenn auch schwächere Einwirkung der gereinigten Arginase auf Acetylphenylalanyl- oder Acetylleucyl-arginin beobachtet hat.

Auf Grund dieser vergleichenden Beobachtungen betreffs der Eigenschaften der fraktionierten Erepsinhydrolyse kann man wohl schliessen, dass Pepton und Trypton gegenüber fraktionierten Erepsinwirkungen sich in ähnlicher Weise verhalten, aber dass doch noch einige Verschiedenheiten im quantitativen Sinne bei der Digestion sowie in den Digestaten bemerkt werden.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Die Fraktionierung der Peptonkörper durch Darmerepsinwirkung wurde in folgender Weise ausgeführt. 120 g Gelatopepton (od. Gelatotrypton), in 450 ccm Pufferlösung (PH 7,5 mit Phosphat-Citrat Puffer) gelöst, wurden mit 15 ccm Erepsinlösung (1 Teil Darmschleimhautbrei des Schweines mit 2 Teilen Glycerinwasser (1:1)) versetzt und unter Toluolzusatz bei 37°C der ersten Digestion unterworfen.

Als Kontrolle wurden 450 ccm Pufferlösung (PH 7,5) mit 15 ccm Erepsinlösung ohne Substrat wie beim Hauptversuch digeriert. Nach 4 Tagen wurde 1 ccm Digestionslösung für die Bestimmung und 100 ccm für die Fällung des partiellen Hydrolysats durch Erepsin abpipettiert.

Die Restlösung wurde der weiteren Digestion unter den oben angegebenen Bedingungen unterworfen. Nach 4 Tagen wurde 1 ccm Digestionslösung für die Bestimmung und 100 ccm für die

Fällung abpipettiert.

Die Fällung des partiellen Hydrolysatsproduktes wurde mit genügender Menge Phosphorwolframsäure ausgeführt und nach 24 Std. abgesaugt. Jeder einzelne Niederschlag sowie die entsprechenden Filtrate wurden in bekannter Weise mit Baryt zerlegt, überschüssiges Barium mit CO_2 gefällt, das von $BaCO_3$ abfiltrierte Filtrat dann im Vacuum zu Sirup eingeengt und schliesslich mit Alkohol und Aceton versetzt, bis Ausscheidung des Spaltungsproduktes nicht mehr bemerkt wurde. Das von der Wolframsäurefällung abfiltrierte Filtrat wurde in bekannter Weise von Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure befreit und zu Sirup eingeengt. Durch Zusatz von genügender Menge Aceton wurde die Fällung aus dem Filtrat erzielt.

Die Erepsinwirkung auf Peptonkörper und die chemischen Eigenschaften der fraktionierten Niederschläge des partiellen Erepsinhydrolysates des Peptonkörpers sind im Folgenden zusammengefasst. In allen Angaben ist der Aschengehalt korrigiert.

Versuch 1. Die partielle Spaltung des Gelatopeptons durch Erepsinwirkung (Tabelle II).

TABELLE II.

Fraktionierte Erepsinwirkung auf Gelatopepton.

Zeit (Tage)	Hauptversuch		Kontrolle		Zunahme
	mg Gesamtstickstoff in 5 ccm	mg NH_2-N in 1 ccm	mg Gesamtstickstoff in 5 ccm	mg NH_2-N in 1 ccm	mg NH_2-N in 1 ccm
Erster Erepsinzusatz					
sofort	2,01	0,27	0,15	0	
4	2,04	0,88	0,13	0,03	0,58
Zweiter Erepsinzusatz					
sofort	2,04	0,88	0,13	0,03	
4	2,03	1,12	0,15	0,03	0,24
Dritter Erepsinzusatz					
sofort	2,03	1,12	0,15	0,03	
4	2,02	1,31	0,15	0,03	0,19

TABELLE III.
Farben- und Fällungsreaktion des fraktionierten Erepsinhydrolysats des Gelatopeptons.

Reaktion und Reagenz		Digestion I		Digestion II		Digestion III	
		Niederschlag 1	Filtrat	Niederschlag 2	Filtrat	Niederschlag 3	Filtrat
Farbenreaktion	Biuret	+	−	+	−	±	−
	Ninhydrin	+	−	+	+	+	+
	Millon	−	−	−	−	−	−
	Sakaguchi	+	−	+	−	+	−
	Anhydrid	+	−	+	−	+	−
	Diazo	+	−	+	−	+	−
	Nessler	±	−	−	−	−	−
Fällungsreaktion	Alkohol	+	+	+	+	+	+
	Aceton	+	+	+	+	+	+
	Phosphorwolframsäure	+	−	+	−	+	−
	Tannin	+	−	+	−	−	−
	Sublimat	−	−	−	−	−	−
	Picrinsäure	−	−	−	−	−	−

Erepsinhydrolysat der I. Digestion des Peptons.

A) Niederschlag 1. Ausbeute = 12,0 g

Gesamtstickstoff: 0,0831 g Subst.: 8,2 ccm $N/10$ H_2SO_4 N = 13,81%
Aminostickstoff: 0,0034 g Subst.: NH_2-N = 0,15 mg = 4,41%
Asche: 0,2262 g Subst.: Asche = 0,0038 g = 1,68%

B) Fällung aus dem Filtrat. Ausbeute = 3,24 g

Gesamtstickstoff: 0,0173 g Subst.: 0 ccm N/10 H_2SO_4
Aminostickstoff: 0,0087 g Subst.: NH_2-N = 0 mg
Asche: 0,1440 g Subst.: Asche = 0,1240 g = 86,11%

Erepsinhydrolysat der II. Digestion des Peptons.

A) Niederschlag 2. Ausbeute = 18,5 g

Gesamtstickstoff: 0,1122 g Subst.: 11,5 ccm $N/10$ H_2SO_4 N = 14,35%
Aminostickstoff: 0,0059 g Subst.: NH_2-N = 0,28 mg = 4,75%
Asche: 0,2316 g Subst.: Asche = 0,0138 g = 5,96%

B) Fällung aus dem Filtrat. Ausbeute = 5,5 g

Gesamtstickstoff: 0,2097 g Subst.: 22,9 ccm $N/10$ H_2SO_4 N = 15,29%

Aminostickstoff: 0,0104 g Subst.: NH_2-N = 1,48 mg = 14,23%
Asche: 0,1550 g Subst.: Asche = 0,0700 g = 45,16%

Erepsinhydrolysat der III. (letzten) Digestion des Peptons.

A) Niederschlag 3. Ausbeute = 19,0 g

Gesamtstickstoff: 0,2714 g Subst.: 28,8 ccm $N/10$ H_2SO_4 N = 14,86%
Aminostickstoff: 0,0543 g Subst.: NH_2-N = 4,19 mg = 7,72%
Asche: 0,4596 g Subst.: Asche = 0,0144 g = 3,13%

B) Fällung aus dem Filtrat. Ausbeute 8,5 g

Gesamtstickstoff: 0,1826 g Subst.: 24,1 ccm $N/10$ H_2SO_4 N = 18,48%
Aminostickstoff: 0,0091 g Subts.: NH_2·N = 1,47 mg = 16,15%
Asche: 0,3550 g Subst.: Asche = 0,1810 g = 50,99%

Versuch 2. Wiederholte Wirkung der gereinigten Arginase (1931) auf fraktionierte Erepsinhydrolysate des Gelatopeptons (Tabelle IV, V u. VI).

TABELLE IV.
Der durch Arginase spaltbare Argininstickstoff in Niederschlag 1.

Zeit		Niederschlag 1 g in 30 ccm Digestionslösung	ccm $N/50$ H_2SO_4	Gespaltener Arginin-N %
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Niederschlag 1	Sofort	0,5114	0	
	Erster Enzymzusatz 48 Std.	0,4546	27,6	1,70
	Zweiter Enzymzusatz 48 Std.	0,3897	24,8	1,78
	Dritter Enzymzusatz 48 Std.	0,3118	19,8	1,78
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Totalhydrolysat	Sofort	0,5114	2,3	
	Erster Enzymzusatz 48 Std.	0,4546	37,0	2,15
	Zweiter Enzymzusatz 48 Std.	0,3897	32,2	2,18
	Dritter Enzymzusatz 48 Std.	0,3118	25,6	2,17

Tabelle V.

Der durch Arginase spaltbare Argininstickstoff in Niederschlag 2.

Zeit		Niederschlag 3 g in 30 ccm Digestionslösung	ccm $N/50$ H_2SO_4	Gespaltener Arginin-N %
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Niederschlag 2	Sofort	0,5628	0	
	Erster Enzymzusatz 48 Std.	0,5002	36,3	2,03
	Zweiter Enzymzusatz 48 Std.	0,4288	30,6	2,00
	Dritter Enzymzusatz 48 Std.	0,3430	24,5	2,00
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Totalhydrolysat	Sofort	0,5628	2,4	
	Erster Enzymzusatz 48 Std.	0,5002	41,1	2,18
	Zweiter Enzymzusatz 48 Std.	0,4288	34,0	2,10

Tabelle VI.

Der durch Arginase spaltbare Argininstickstoff in Niederschlag 3.

Zeit		Niederschlag 2 g in 30 ccm Digestionslösung	ccm $N/50$ H_2SO_4	Gespaltener Arginin-N %
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Niederschlag 3	Sofort	0,6877	0	
	Erster Enzymzusatz 48 Std.	0,6112	46,3	2,12
	Zweiter Enzymzusatz 48 Std.	0,5239	39,3	2,10
	Dritter Enzymzusatz 48 Std.	0,4192	32,5	2,17
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Totalhydrolysat	Sofort	0,7640	4,9	
	Erster Enzymzusatz 48 Std.	0,6791	45,6	1,70
	Zweiter Enzymzusatz 48 Std.	0,5822	42,0	1,84
	Dritter Enzymzusatz 48 Std.	0,4657	37,8	2,09

Versuch 3. Die partielle Spaltung des Tryptons durch Erepsinwirkung (Tabelle VII).

Die Enzymversuche wurden unter den gleichen Bedingungen wie Versuch 1 angestellt. Die Resultate sind kurz zusammengefasst, wie folgt:

Die NH_2-N Zunahme in 1 ccm Digestionlösung (4 Tage) nach dem ersten Enzymzusatz betrug 0,21 mg, nach dem zweiten 0,20 mg, nach dem dritten 0,21 mg und nach dem vierten 0 mg.

Erepsinhydrolysat der I. Digestion des Tryptons.

A) Niederschlag 1. Ausbeute = 6,0 g

Gesamtstickstoff:	0,1021 g	Subst.:	10,1 ccm $N/10$ H_2SO_4 N = 13,85%
Aminostickstoff:	0,0052 g	Subst.:	NH_2-N = 0,21 mg = 4,04%
Asche:	0,4950 g	Subst.:	Asche = 0,0100 g = 2,02%

B) Fällung aus dem Filtrat. Ausbeute = 1,5 g

Gesamtstickstoff:	0,0840 g	Subst.:	4,7 ccm $N/10$ H_2SO_4 N = 7,83%
Aminostickstoff:	0,0047 g	Subst.:	NH_2-N = 0,25 mg = 5,32%
Asche:	0,1330 g	Subst.:	Asche = 0,0660 g = 49,62%

Erepsinhydrolysat der II. Digestion des Tryptons.

A) Niederschalg 2. Ausbeute = 6,4 g

Gesamtstickstoff:	0,1374 g	Subst.:	12,5 ccm $N/10$ H_2SO_4 N = 12,74%
Aminostickstoff:	0,0046 g	Subst.:	NH_2-N = 0,24 mg = 5,22%
Asche:	0,1780 g	Subst.:	Asche = 0,0050 g = 2,81%

B) Fällung aus dem Filtrat. Ausbeute = 2,5 g

Gesamtstickstoff:	0,1815 g	Subst.:	4.3 ccm $N/10$ H_2SO_4 N = 3,32%
Aminostickstoff:	0,0093 g	Subst.:	NH_2-N = 0,26 mg = 2,80%
Asche:	0,1976 g	Subst.:	Asche = 0,0936 g = 47,37%

Erepsinhydrolysat der III (letzten) Digestion des Tryptons.

A) Niederschlag 3. Ausbeute = 9,0 g

Gesamtstickstoff:	0,4309 g	Subst.:	50,0 ccm $N/10$ H_2SO_4 N = 16,25%
Aminostickstoff:	0,0560 g	Subst.:	NH_2-N = 5,45 mg = 9,73%

B) Fällung aus dem Filtrat. Ausbeute = 10,2 g

Gesamtstickstoff:	0,3184 g	Subst.:	22,7 ccm $N/10$ H_2SO_4 N = 9,98%
Aminostickstoff:	0,0318 g	Subst.:	NH_2-N = 2,46 mg = 7,74%
Asche:	0,2430 g	Subst.:	Asche = 0,0458 g = 18,85%

TABELLE VII.
Farben- und Fällungsreaktion des fraktionierten Erepsinhydrolysats des Tryptons.

Reaktion und Reagenz		Digestion I		Digestion II		Digestion III	
		Niederschlag 1	Filtrat	Niederschlag 2	Filtrat	Niederschlag 3	Filtrat
Farbenreaktion	Biuret	+	−	+	−	−	−
	Ninhydrin	+	+	+	+	+	+
	Millon	−	−	−	−	−	−
	Sakaguchi	+	−	+	−	+	−
	Anhydrid	+	−	+	−	+	−
	Diazo	+	−	+	−	+	−
	Nessler	−	−	±	±	−	±
Fällungsreaktion	Alkohol	+	+	+	+	+	+
	Aceton	+	+	+	+	+	+
	Phosphorwolframsäure	+	−	+	−	+	−
	Tannin	+	−	+	−	−	−
	Sublimat	−	−	−	−	−	−
	Picrinsäure	−	−	−	−	−	−

Versuch 4. Wiederholte Wirkung der gereinigten Arginase auf fraktionierte Erepsinhydrolysate des Tryptons
(Tabelle VIII, IX u. X).

TABELLE VIII.
Der durch Arginase spaltbare Argininstickstoff in Niederschlag 1.

Zeit		Niederschlag 1 g in 30 ccm Digestionslösung	ccm $N/50$ H_2SO_4	Gespaltener Arginin-N %
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Niederschlag 1	Sofort	0,4120	3,0	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,3662	21,0	1,41
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,3147	25,5	2,07
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2506	19,0	1,91
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Totalhydrolysat	Sofort	0,6356	8,0	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,5649	49,5	2,10
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,4842	47,0	2,37

TABELLE IX.

Der durch Arginase spaltbare Argininstickstoff in Niederschlag 2.

Zeit		Niederschlag 2 g in 30 ccm Digestionslösung	ccm $N/50$ H_2SO_4	Gespaltener Arginin-N %
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Niederschlag 2	Sofort	0,3017	9,6	
	Erster Enzymzusatz 48 Std.	0,2682	—	—
	Zweiter Enzymzusatz 48 Std.	0,2298	25,5	2,22
	Dritter Enzymzusatz 48 Std.	0,1839	20,0	2,16
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Totalhydrolysat	Sofort	0,6273	6,0	
	Erster Enzymzusatz 48 Std.	0,5573	49,5	2,22
	Zweiter Enzymzusatz 48 Std.	0,4779	45,0	2.37
	Dritter Enzymzusatz 48 Std.	0,3823	35,9	2,36

TABELLE X.

Der durch Arginase spaltbare Argininstickstoff in Niederschlag 3.

Zeit		Niederschlag 3 g in 30 ccm Digestionslösung	ccm $N/50$ H_2SO_4	Gespaltener Arginin-N %
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Niederschlag 3	Sofort	0,3897	2,0	
	Erster Enzymzusatz 48 Std.	0,3460	33,4	2,56
	Zweiter Enzymzusatz 48 Std.	0,2966	28,7	2,57
	Dritter Enzymzusatz 48 Std.	0,2373	22,9	2,56
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Totalhydrolysat	Sofort	0,5326	1,5	
	Erster Enzymzusatz 48 Std.	0,4735	46,5	2,67
	Zweiter Enzymzusatz 48 Std.	0,4101	38,5	2,55

LITERATUR.

Edlbacher, S. u. Burchard, H. (1931): Zeit. f. physiol. Chem., **194**, 69.
Kaiju, M. (1938): Ber. d. Instituts f. chem. Forschung d. Kaiserl. Univ. Kyoto. **9** (im Druck) (japanisch).
Mori, T. (1938): Diese Zeit., **28**, 191.

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

ÜBER DIE PEPTONKÖRPER DER GELATINE.

III. Mitteilung. Das fraktionierte Pepton und Trypton.

Von

TOSHIO MORI.

(*Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Fakultät Nagasaki. Direktor: Prof. Dr. Senji Utzino.*)

(Eingegangen am 19. Mai 1938)

In den beiden vorigen Arbeiten habe ich dargelegt, dass die Peptonkörper: Albumose, Pepton und Trypton, sich gegenüber Protease- oder Arginasewirkung quantitativ sowie auch qualitativ verschieden verhalten, und infolgedessen als sehr wahrscheinlich angenommen, dass diese Körper in Hinsicht der enzymologischen Einstellung nicht identisch sind. Was die Einheitlichkeit dieser Körper selbst anbelangt, habe ich aber damals diese Frage nicht berührt. Bezüglich des Peptonkörpers wurde schon unter besonderer Berücksichtigung der Fällungsreaktion die Nichteinheitlichkeit des Körpers dargetan (1884, 1886, 1890, 1891 u. 1898).

In vorliegender Arbeit habe ich unter Leitung von Prof. S. Utzino das Verhalten des freien Aminostickstoffs sowie des durch Arginase angreifbaren Argininstickstoffs in drei durch Phosphorwolframsäure fraktionierten Niederschlägen des Peptons oder des Tryptons studiert.

Zur Fraktionierung von 50 g beider Peptonkörper habe ich die Substanz in Lösung zweimal nacheinander mit je 70 g Phosphorwolframsäure und zuletzt mit genügender Menge dieser Säure fraktionierend gefällt. Die Fällung wurde vorsichtig mit Baryt zerlegt, das Filtrat von überschüssigem Baryt durch CO_2 befreit, stark eingeengt und so lange mit Alkohol und Aceton versetzt, als noch Ausfällung auftrat.

Wie aus der zusammenfassenden Tabelle I ersichtlich ist, wurde eine deutliche Zunahme der NH_2-N-Menge im zweiten Niederschlag des fraktionierten Peptons bemerkt und eine noch grössere im dritten, und zwar betrug sie ungefähr 50% des Gesamtstickstoffs, während der durch Arginase gespaltene Argininstickstoff des Totalhydrolysats des dritten Niederschlags etwas minder geworden war.

Der durch Arginase spaltbare Argininstickstoff des zweiten und des letzten Niederschlags des fraktionierten Peptons war fast 3 mal grösser als derjenige des ersten. Unter den in gleicher Weise fraktionierten Tryptonniederschlägen zeigten der erste und zweite Niederschlag eine verhältnismässig grössere durch Arginase spaltbare Arginin-N Menge im Totalhydrolysat als derselbe des fraktionierten Peptons, der dritte (letzte) Niederschlag aber einen auffallend grossen Stickstoffgehalt, infolgedessen einen verhältnismässig kleinen NH_2-N-Prozentssatz auf Gesamtstickstoff, und einen kleineren durch Arginase spaltbaren Argininstickstoffwert im Totalhydrolysat, der aber durch direkte Wirkung der Arginase eine 87%ige Hydrolyse des hydrolysierten Gesamtarginins zeigte, während die Aminostickstoff- sowie die durch Arginase spaltbare Argininsticktsoffmenge des ersten und des zweiten Niederschlags sehr ähnliche Werte betrugen. Im letzten Niederschlag der Tryptonfraktion hat man es hier vielleicht mit einer Substanz zu tun, welche hauptsächlich N-reiche Aminosäure z. B. Arginin enthält, welches durch Arginasewirkung sehr leicht angreifbar ist, wenn man auch einen Peptidkomplex annehmen sollte. Nicht unerwähnt soll es bleiben, dass der dritte Niederschlag des fraktionierten Tryptons sich als etwas ammonhaltig erwies (Tabelle II).

Da nach der Arbeit S. Fujitas[1] im hiesigen Institut auch das freie Arginin, wenn auch nur in kleinen Mengen, nach langdauernder Einwirkung von Trypsin-Grübler auf Gelatine isoliert werden konnte, ist es infolgedessen nicht ganz ausgeschlossen, dass der dritte Niederschlag des Tryptons eine gewisse Menge freies Arginins enthielt und grossenteils durch Arginase leicht angreifbar war, während derjenige des Peptons durch Arginase nur auf 39% des Gesamtarginins gespalten werden konnte.

Zu erwähnen wäre ferner, dass einigen Fällungsreagenzien gegenüber die drei Niederschläge des fraktionierten Peptons sowie der erste des Tryptons sich fast gleich verhalten, während der zweite und der letzte Niederschlag des Tryptons dagegen durch Sublimat nicht fällbar sind (Tabelle II). Zum Vergleich habe ich hier auch die Eigenschaften des Gesamtniederschlags angegeben, der durch genügende Menge Phosphorwolframsäure ausgefällt wurde.

---

[1] Noch nicht veröffentlicht.

Auf Grund dieser Beobachtungen, die unter besonderer Berücksichtigung der Aminostickstoffmenge sowie der Arginaseeinstellung ausgeführt wurden, möchte ich auch annehmen, dass das Gelatopepton oder das Gelatotrypton selbst ein nichteinheitliches Produkt darstellt. Über das biologische Verhalten der beiden Körper gedenke ich demnächst zu berichten.

TABELLE I.

Zusammenfassende Ergebnisse des fraktionierten Gelatopeptons und des Gelatotryptons.

Substrate	Gelatopepton			Gelatotrypton			
	Niederschlag I	Niederschlag II	Niederschlag III	Niederschlag I	Niederschlag II	Niederschlag III	Gesamtniederschlag
Gesamt-N (%)	15,05	15,03	15,88	14,40	15,34	22,64	16,86
Amino-N (%)	2,74	3,84	8,07	3,57	3,65	8,86	4,09
Amino-N/Gesamt-N	18,21	25,55	50,82	24,79	23,79	39,13	24,26
Durch Arginase spaltbarer Arginin-N in Totalhydrolysat (%)	1,99	1,90	1,53	3,46	3,75	1,38	3,00
Spaltbarer Hydrolysatarginin-N /Gesamt-N	13,22	12,64	9,63	24,03	24,45	6,10	17,79
Durch Arginase spaltbarer Arginin-N in Niederschlag (%)	0,24	0,66	0,60	0,63	0,66	1,20	0,51
Spaltbarer Arginin-N/Gesamt-N	1,59	4,39	3,78	4,38	4,30	5,30	3,03
Spaltbarer Arginin-N/Sapltbarer Hydrolysatarginin-N	12,06	34,74	39,22	18,21	17,60	86,96	17,00

EXPERIMENTELLER TEIL.

Versuch 1. Die Fraktionierung der Peptonkörper durch Phosphorwolframsäure.

50 g Gelatopepton (od. Gelatotrypton), in 100 ccm 5% H_2SO_4 gelöst, wurden mit 70 g Phosphorwolframsäure (280 ccm 5% H_2SO_4 Lösung) gefällt und nach 24 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur abfiltriert (Niederschlag I). Das Filtrat wurde durch weiteren Zusatz von 70 g Phosphorwolframsäure gefällt und abfiltriert (Niederschlag II). Das letzte Filtrat wurde mit einer genügenden Menge Phosphorwolframsäure versetzt, bis kein Niederschlag mehr zu bemerken war, und abfiltriert (Niederschlag III). Die einzelnen Niederschläge I, II u. III sowie das letzte Filtrat wurden mit Baryt zerlegt, das Filtrat mit CO_2 gesättigt und abfiltriert. Das Filtrat wurde im Vacuum zu Sirup eingeengt und schliesslich mit Alkohol und Aceton versetzt. Die letzte durch Phosphorwolframsäure unfällbare Lösung wurde von überschüssiger Wolframsäure in bekannter Weise befreit, stark eingeengt und mit Aceton versetzt, um die gelöste Substanz auszuscheiden. Die Analysenwerte der fraktionierten Niederschläge sind kurz zusammengefasst, wie folgt:

A) Die Fraktionierung des Gelatopeptons. (In allen folgenden Angaben ist der Aschengehalt korrigiert.)

Niederschlag I. Ausbeute = 27,5 g

Gesamtstickstoff: 0,1479 g Subst.: 15,9 ccm *N*/10 H_2SO_4 N = 15,05%
Aminostickstoff: 0,0296 g Subst.: NH_2-N = 0,81 mg = 2,74%
Asche: 0,3049 g Subst.: Asche = 0,0250 g = 8,19%

Niederschlag II. Ausbeute = 6,5 g

Gesamtstickstoff: 0,1397 g Subst.: 15,0 ccm *N*/10 H_2SO_4 N = 15,03%
Aminostickstoff: 0,0279 g Subst.: NH_2-N = 1,07 mg = 3,84%
Asche: 0,2740 g Subst.: Asche = 0,0223 g = 8,14%

Niederschlag III. Ausbeute = 3,29 g

Gesamtstickstoff: 0,1164 g Subst.: 13,2 ccm *N*/10 H_2SO_4 N = 15,88%
Aminostickstoff: 0,0233 g Subst.: NH_2-N = 1,88 mg = 8,07%
Asche: 0,2664 g Subst.: Asche = 0,0317 g = 11,90%

Niederschlag aus dem Filtrat. Ausbeute=2,0 g

Gesamtstickstoff: 0,4000 g Subst.: 1,5 ccm $N/10$ H_2SO_4 N=0,53%
Aminostickstoff: 0,0020 g Subst.: NH_2-N=0 mg
Asche: 0,0648 g Subst.: Asche=0,0294 g=45,37%

B) Die Fraktionierung des Gelatotryptons.

Niederschlag I. Ausbeute=27,2 g

Gesamtstickstoff: 0,0700 g Subst.: 7,2 ccm $N/10$ H_2SO_4 N=0,53%
Aminostickstoff: 0,0070 g Subst.: NH_2-N=0,25 mg=3,57%
Asche: 0,1292 g Subst.: Asche=0,0090 g=6,97%

Niederschlag II. Ausbeute=4,0 g

Gesamtstickstoff: 0,2026 g Subst.: 22,2 ccm $N/10$ H_2SO_4 N=15,34%
Aminostickstoff: 0,0405 g Subst.: NH_2-N=1,48 mg=3,65%
Asche: 0,2766 g Subst.: Asche=0,0063 g=2,28%

Niederschlag III. Ausbeute=1,6 g

Gesamtstickstoff: 0,0810 g Subst.: 13,1 ccm $N/10$ H_2SO_4 N=22,64%
Aminostickstoff: 0,0324 g Subst.: NH_2-N=2,87 mg=8,86%
Asche: 0,1602 g Subst.: Asche=0,0060 g=3,75%

Niederschlag aus dem Filtrat. Ausbeute=4,8 g

Gesamtstickstoff: 0,0354 g Subst.: 2,8 ccm $N/10$ H_2SO_4 N=11,07%
Aminostickstoff: 0,0018 g Subst.: NH_2-N=0,17 mg=9,44%
Asche: 0,2940 g Subst.: Asche=0,2482 g=84,42%

C) Die Ausfällung des Gelatotryptons durch Phosphorwolframsäure.

50 g Gelatotrypton, das in 110 ccm 5% H_2SO_4 gelöst war, wurden mit 170 g Phosphorwolframsäure (680 ccm 5% H_2SO_4 Lösung) gefällt und nach 24 stündigem Stehen abfiltriert. Im Filtrat wurde bei weiterem Phosphorwolframsäurezusatz kein Niederschlag mehr bemerkt. Der Niederschlag oder das Filtrat wurde mit Baryt zerlegt, das Filtrat mit CO_2 durchleitet und abfiltriert. Die beiden im Vacuum zu Sirup eingeengten Lösungen wurden schliesslich mit Alkohol und Aceton versetzt, um einerseits die

Tryptonfraktion und anderseits die durch Phosphorwolframsäure unfällbare Fraktion auszuscheiden.

Gesamtniederschlag: Ausbeute = 23,0 g

Gesamtstockstoff: 0,0880 g Subst.: 10,6 ccm $N/10$ H_2SO_4 N = 16,86%
Aminostickstoff: 0,0044 g Subst.: NH_2-N = 0,19 mg = 4,09%

Fällung aus dem Filtrat: Ausbeute = 4,0 g

Gesamtstickstoff: 0,0354 g Subst.: 2,8 ccm $N/10$ H_2SO_4 N = 11,07%
Aminostickstoff: 0,0018 g Subst.: NH_2-N = 0,17 mg = 9,44%
Asche: 0,2940 g Subst.: Asche = 0,2482 g = 84,42%

TABELLE II.
Farben- und Fällungsreaktion des fraktionierten Peptons und Tryptons.

Reagenz und Reaktion		Fraktioniertes Pepton				Fraktioniertes Trypton			
		Niederschlag I	Niederschlag II	Niederschlag III	Filtrat	Niederschlag I	Niederschlag II	Niederschlag III	Filtrat
Farbenreaktion	Biuret	+	+	+	−	+	+	+	−
	Ninhydrin	+	+	+	−	+	+	+	±
	Millon	−	−	−	−	−	−	−	−
	Sakaguchi	+	+	+	−	+	+	+	−
	Anhydrid	+	+	+	−	+	−	−	−
	Molisch	+	+	±	−	+	±	±	−
	Diazo	+	+	±	−	+	+	+	−
	Nessler	−	−	−	−	−	−	+	−
Fällungsreaktion	Alkohol	+	+	+	+	+	+	+	+
	Aceton	+	+	+	+	+	+	+	+
	Phosphorwolframsäure	+	+	+	−	+	+	+	−
	Tannin	+	+	+	−	+	+	+	−
	Sublimat	±	±	±	−	+	−	−	−

Versuch 2. Wiederholte Wirkung der gereinigten Arginase (Edlbacher, 1931) auf 3 fraktionierte Peptonniederschläge.

Tabelle III.

Der durch Arginase spaltbare Argininstickstoff in Peptonniederschlag I.

Zeit		Niederschlag I g in 30 ccm Digestionslösung	ccm $N/50$ H_2SO_4	Gespaltener Arginin-N %
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Niederschlag I	Sofort	0,3222	0	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2899	2,5	0,24
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2537	2,0	0,22
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Totalhydrolysat	Sofort	0,4020	2,0	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,3617	27,1	1,96
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,3540	24,4	1,79
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2450	18,6	1,99

Tabelle IV.

Der durch Arginase spaltbare Argininsstockstoff in Peptonniederschlag II.

Zeit		Niederschlag II g in 30 ccm Digestionslösung	ccm $N/50$ H_2SO_4	Gespaltener Arginin-N %
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Niederschlag II	Sofort	0,3042	1,9	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2738	6,8	0,53
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2396	7,1	0,66
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,1996	5,8	0,64
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Totalhydrolysat	Sofort	0,2726	5,0	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2453	21,0	1,89
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2147	18,5	1,90
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,1334	11,3	1,86

TABELLE V.

Der durch Arginase spaltbare Argininstickstoff in Peptonniederschlag III.

Zeit		Niederschlag III g in 30 ccm Digestionslösung	ccm $N/50$ H_2SO_4	Gespaltener Arginin-N %
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Niederschlag III	Sofort	0,2643	0	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2378	5,0	0,59
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2081	4,0	0,54
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,1734	3,7	0,59
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Totalhydrolysat	Sofort	0,2759	2,0	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2483	15,3	1,53
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2172	—	—
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,1810	11,0	1,50

Versuch 3. Wiederholte Wirkung der gereinigten Arginase auf 3 fraktionierte Tryptonniederschläge.

TABELLE VI.

Der durch Arginase spaltbare Argininstickstoff in Tryptonniederschlag I.

Zeit		Niederschlag I g in 30 ccm Digestionslösung	ccm $N/50$ H_2SO_4	Gespaltener Arginin-N %
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Niederschlag I	Sofort	0,3936	0	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,3543	8,0	0,63
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,3100	6,0	0,54
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2883	5,9	0,57
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Totalhydrolysat	Sofort	0,5788	2,0	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,5145	62,5	3,30
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,4410	54,3	3,35
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,3528	44,8	3,46

TABELLE VII.

Der durch Arginase spaltbare Argininstickstoff in Tryptonniederschlag II.

Zeit		Niederschlag II g in 30 ccm Digestionslösung	ccm $N/50$ H_2SO_4	Gespaltener Arginin-N %
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Niederschlag II	Sofort	0,4052	0	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,6346	8,0	0,61
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,3191	7,5	0,66
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2659	6,3	0,66
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Totalhydrolysat	Sofort	0,4439	2,5	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,3992	53,5	3,59
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,3362	46,9	3,75
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2690	36,7	3,66

TABELLE VIII.

Der durch Arginase spaltbare Argininstickstoff in Tryptonniederschlag III.

Zeit		Niederschlag III g in 30 ccm Digestionslösung	ccm $N/50$ H_2SO_4	Gespaltener Arginin-N %
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Niederschlag III	Sofort	0,2433	0	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2189	9,2	1,18
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,1918	8,2	1,20
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,1597	5,7	1,00
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Totalhydrolysat	Sofort	0,2654	1,9	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2359	11,6	1,18
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,2022	11,4	1,38
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,1618	9,1	1,38

Versuch 4. Wiederholte Wirkung der gereinigten Arginase auf Gesamtniederschlag des Gelatotryptons durch Phosphorwolframsäure.

TABELLE IX.

Der durch Arginase spaltbare Argininstickstoff im durch Phosphorwolframsäure gefällten Gesamtniederschlag.

Zeit		Substanz g in 30 ccm Digestionslösung	ccm $N/50$ H_2SO_4	Gespaltener Arginin-N %
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Gesamtniederschlag	Sofort	0,5241	0	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,4717	8,6	0,51
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,4114	7,3	0,50
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,3446	6,3	0,51
Durch Arginase gespaltener Arginin-N in Totalhydrolysat	Sofort	0,6741	2,7	
	Erster Enzymzusatz			
	48 Std.	0,5993	62,0	2,79
	Zweiter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,5136	57,0	3,00
	Dritter Enzymzusatz			
	48 Std.	0,4110	44,1	2,89

LITERATUR.

Chittenden, R. H. u. Hartwell, J. A. (1890/1891): Journ. of Physiol., **11**, 435; **12**, 12.

Edlbacher, S. u. Burchard, H. (1931): Zeit. f. physiol. Chem., **194**, 69.

Kühne, W. u. Chittenden, R. H. (1884/1886): Zeit. f. Biol., **20**, 11; **22**, 423.

Mori, T. (1938): Diese Zeit., **28**, 191, 203.

Neumeister, R. (1890): Zeit. f. Biol., **26**, 324.

Pick, E. P. (1898): Zeit. f. physiol. Chem., **24**, 246.

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

ON THE NUCLEIC ACID OF TYPHOID BACILLUS OF MICE.

BY

SYÛZO AKASI.

(*From the Medico-chemical Institute, Kyoto Imperial University. Director: Prof. K. Mayeda.*)

(Received for publication, June 20, 1938)

We have little information regarding the nucleic acid of bacteria, whether concerning a pathogenic or a non-pathogenic bacteria. Studies of nucleic acids have been made with coli bacillus by Schaffer, Forkoff, and Jone (1922), with azotobacter by Mockeridge (1924), with tubercle bacillus by Ruppel (1898–99) and later by Johnson and Brown (1922 & 1923), and with timothy bacillus (1931) as well as diphtheria bacillus (1932) recently by Coghill. All the workers were truly in accord with the finding that bacterial cells contain generally a nucleic acid as a cell constituent, but the individual results indicated a marked difference from each other, so that as to the question whether it deals with the animal or the plant type of nucleic acid, or in another term, lately introduced, a ribose or a desoxyribose nucleic acid, a definite answer has not yet been offered. For the purpose of aquiring a clear knowledge of this problem many detailed investigations extending also to various bacilli are desired, notwithstanding the fact that in this field of study many difficulties are naturally encountered, the foremost being to prepare a sufficient amount of investigation materials from bacteria, in whose cultivation enormous expense is involved, and secondly, to submit the crude product to a rigorous purification for detailed chemical analysis. The present paper reports the study of nucleic acid of typhoid bacillus of a mouse, which was conducted with the aim of obtaining material from bacilli in a high state of purity and to make a precise analysis of it in many respects, so that a comparison of results with those of the other known nucleic acids might be drawn.

EXPERIMENTAL.

Cultivation and Preparation of Bacillus Material.

The typhoid bacillus of a mouse of the strain, Tohoku 101, with which the writer was supplied for study, was cultivated and collected in the following way: It was grown by means of a special cultivation vessel equipped with the solid culture medium composed of 25.0 gm. of condensed extract of bonito fish, 25.0 gm. of Teruuchi's peptone, 30.0 gm. of agar-agar, and 1000 cc. of water. After keeping the inoculated cultivation vessel for 48 hours in an incubator at 38°, the grown bacilli were washed out of the vessels with distilled water containing 0.5% by volume of formaline, and all the washing fluids holding bacilli in suspension were brought together into the stoppered bottles, which were then kept for 72 hours in an incubator at 37° so as to secure a perfect sterilization. The combined fluids were then passed through a Sharple's centrifuge, which effected the separation of bacilli from the washing fluid. The bacilli thus obtained in the form of a thick paste were spread upon the sterilized absorption plates, dried in vacuo at 45° and finally ground to a slightly yellowish, white powder.

This bacillus material, weighing 500 gm., was at first extracted exhaustively with ether in order to remove the fatty substance, the analytical research of which will be given in a future publication, and then the fat-freed bacilli were employed for the preparation of nucleic acid as follows.

Isolation of Crude Nucleic Acid.

This was carried out following essentially the method which Coghill used for the preparation of nucleic acid from timothy grass hay bacillus.

450 gm. of bacteria, as given above, were ground in a mortar with 2 litres of 2% sodium hydroxide solution to make a thick paste and allowed to stand an hour at room temperature. Then 2

litres of water were added, mixed thoroughly, and treated with acetic acid until a neutrality towards lithmus was reached. The mixture was transferred in a centrifuge bottle and centrifuged. The strong turbid supernatant fluid was separated from the resultant precipitate, which was washed once by suspending in 2.5 litres of distilled water and again centrifuged. The combined filtrate and washings were treated with dilute colloidal ferric hydroxide solution with vigorous stirring in order to get a smooth filtration by filtering the mixture off through fluted filter papers. The clear filtrate was acidified with hydrochloric acid to an acid reaction to congo red indicator. Then an equal volume of alcohol was added and the precipitated nucleic acid was centrifuged and treated with alcohol and ether. The crude nucleic acid, thus obtained, weighed 20 gm. when dried in the air. This substance was not, however, in so high a state of purity as described by Coghill in the case of timothy bacillus, and judging from the strong biuret reaction observed, it seemed to contain a considerable amount of proteins. The preliminary test of purification with a small sample was carried out in an ordinary manner, namely, by dissolution in alkaline and reprecipitation with acid. This attempt was, however, unsuccessful, since even after five repetitions of a similar procedure the sample could not be rendered entirely free from biuret test, and in addition each purification procedure involved a serious loss of materials. On this account an easy purification method which leads to the production of pure nucleic acid was developed, as described in the following.

Purification of Crude Nucleic Acid.

15 gm. of crude nucleic acid were dissolved in 200 cc. of 10% sodium acetate solution and 5 volumes of glacial acetic acid were added. A small quantity of insoluble matter was removed by centrifugation and the filtrate was treated with enough 10% copper chloride solution to cause nucleic acid as a copper salt to flock out. After standing a short time, the precipitate was centrifuged and washed twice with glacial acetic acid. Then the copper salt was decomposed by treating with acetone containing hydrochloric acid

in 5% and the acetone solution was discarded after centrifugation. This treatment was twice repeated in a similar manner. The precipitate of almost white color finally obtained was suspended in a little water and dissolved by the addition of a small amount of sodium hydroxide solution. After eliminating the slight insoluble matter by centrifugation the clear solution was acidified with hydrochloric acid until acid reaction towards congo red was attained. This solution was transferred into centrifuge bottles and upon addition of two volumes of alcohol, the separated precipitate of the free nucleic acid was centrifuged. It was then treated with alcohol and ether and finally dried in the air. The yield was 5.5 gm., corresponding therefore to 1.6% of the original bacilli.

It formed a white, non-hygroscopic powder, and was easily soluble in concentrated acetic acid. The concentrated aqueous solution of its sodium salt presented neither a gelatinous nor a viscous fluid, as is usually the case with sodium salt of thymonucleic acid. The biuret reaction was not proved in the ordinary manner as well as by the special technique of Osborne—this was done by operating the test in the usual way, then adding 10 or 20 drops of ethyl alcohol and a stick of solid potassium hydroxide, when the alkali salts out the alcohol, which brings with it any of the biuret color, if present. With a pure sample both the phloroglucinol and orcinol tests for pentose were proved and further a positive Shiff's fuchsin sulfurous acid reaction or Feulgen's nuclear reaction was also obtained.

Analysis of the Pure Nucleic Acid.

For analysis the air-dry material was further dried in vacuo at 100° to a constant weight, when it was tinged somewhat with a light brown color.

Nitrogen Content—(Kjeldahl's method).
3.452 mg. substance: 3.70 cc. 0.01 n HCl; 14.63% N.
5.254 ,, ,, : 5.40 ,, ,, ,, ; 14.39 ,, ,, .
Found. average 14.51 ,, ,, .

Phosphorus Content—(Pregl-Lieb's method).
11.321 mg. substance: 71.022 mg. ammonium phosphomolybdate; 9.07% P.

5.980 „ „ : 37.733 „ „ „ ; 9.01 „ „
Found. average 9.04 „ „
(Conversion factor = 0.014525)
Hence Total-N : Total-P = 1.61 : 1

Pentose Content—The determination of pentose was executed employing the method described by Hoffman (1927). The sample was transferred into a 500 cc. distilling flask made according to the directions of the author. 50 cc. of 20% hydrochloric acid were added and distilled with a current of steam for three hours, always keeping the temperature of the reaction mixture constant at 103–105°. The distillate, collected in a measuring flask, was titrated in this flask with 10% sodium hydroxide from a burette to neutrality to phenolphthalein, and the liquid was then diluted to an adequate volume, in the present case 700 cc. The standard solution containing furfural approximately equal to that expected in the distillate was placed in a flask of the same size and treated with hydrochloric acid and sodium hydroxide until the solution was neutral to phenolphthalein, care being taken that the sodium hydroxide added might equal the amount added to the unknown. This solution was also diluted to the mark. 6 cc. of each test and standard solution were transferred to a test tube, each was treated with 0.5 cc. of aniline and 4.0 cc. of glacial acetic acid, allowed to stand for 10 to 15 minutes in the dark, and then compared in a colorimeter. The amount of pentose was caluculated by multiplying the obtained value by a conversion factor = 1.98 in accordance with Coghill (1931), the latter being the average value given for xylose and arabinose by Youngburg (1927).

0.1185 gm. substance: 8.47 mg. furfural; 13.23 mg. pentose.
Found. 14.1% „
For yeast nucleic acid Calculated. 24.6 „ „

A commercial sample of yeast nucleic acid (E. Merck) was analyzed simultaneously for pentose in a similar manner using the same conversion factor as follows:

50.0 mg. substance: 6.52 mg. furfural; 12.90 mg. pentose.
Found. 25.8% „

Thymonucleic Acid Content—This determination was carried out by means of the method introduced by Widström (1928). His method is based upon the fact that when thymonucleic acid is heated with any acid it undergoes a disruption of its desoxyribose component with the formation of a genuine aldehyde, which gives a color reaction with Shiff's fuchsin sulfurous acid reagent and the latter coloration is applicable to the estimation of the original nucleic acid under limited conditions. 1 cc. of the solution of the sample which comprises 0.5 to 10 mg. of thymonucleic acid was taken in a test tube and made predominately acid to congo red by the addition of 0.1 *n* hydrochloric acid and then 10 cc. of citrate buffer solution of pH 2.0 according to Michaelis (30.5 cc. citrate solution + 69.5 cc. 0.1 *n* HCl) were poured into it and thoroughly mixed. Upon heating in a boiling water bath just 2¾ minutes, the test tube was taken out and immediately cooled in running water. A slight insoluble matter was removed by centrifugation and 9 cc. of the clear solution were treated with 3 cc. of the mixed reagent composed of two volumes of citrate buffer solution, as above, and one volume of Feulgen's reagent. On the other hand, simultaneously a similar procedure was undertaken with 1 cc. of the standard solution. This solution was prepared to contain a pure sample of thymonucleic acid in a quantity approximate to that probably present in the test solution, so that the colors developed might be closely matched in a final colorimetery. Feulgen's reagent was thus prepared: 0.5 gm. of fuchsin were dissolved in 100 cc. of water and decolorized by passing a current of sulfurous acid gas and an unfavorable excess of the latter was removed by aeration under a diminished pressure of 15 mm.

The following result was obtained by averaging the values of five colorimetric determinations.

2.692 mg. substance: 0.656 mg. thymonucleic acid.
Found. 24.8% „ „

Isolation and Identification of Pyrimidines.

Cytosine—2.0 gm. of the air-dried substance were hydrolysed with 100 cc. of 25% sulfuric acid in an autoclave maintained at

150–160° for 5 hours. The reaction mixture, upon removal of sulfuric acid with baryta, was treated with silver nitrate solution in order to precipitate purine as silver salt, which was filtered off, and to the filtrate more silver nitrate solution and baryta water were added. The separated pyrimidine silver was decomposed by hydrogen sulfide, the filtrate from silver sulfide was made acid with sulfuric acid and treated with phosphotungstic acid. The precipitate of cytosine phosphotungstate was decomposed with baryta and the solution, free from barium and sulfate ions, separated, upon evaporation, 0.085 gm. of yellowish crystals. These crystals were further purified by converting them first into picrate and then into sulfate which was finally obtained in the form of colorless crystals. Upon drying at 105° their analysis was:

2.530 mg. substance: 4.65 cc. 0.01 *n* HCl.
$(C_4H_5N_3O)_2 \cdot H_2SO_4$ Calculated. 26.25% N
Found. 25.75 „ „

The filtrate from cytosine phosphotungstate precipitate was freed from sulfuric and phosphotungstic acids with baryta and the clear solution, upon evaporation, yielded white crystals, amounting to 0.12 gm. On account of a lack of materials, the isolation of both cytosine and thymine was unsuccessful, but thymine was identified by the acetol test of Johnson-Harkins and uracil, by the color test of Wheeler-Johnson.

Uracil—About 2 gm. of the above sample were dissolved in 2 cc. of water and bromine water was carefully added to form a permanent color, the excess of which was removed by aeration. Then, on the addition of an excess of barium hydroxide solution, a violet blue color was produced. This reaction is indeed given by uracil as well as cytosine, but the latter was supposed to have been practically eliminated by the preceding treatment with phosphotungstic acid, which, in fact, precipitates cytosine in an acid medium, but not uracil.

Thymine—10 mg. of the same sample, mentioned above, were dissolved in 50 cc. of water; bromine was added to a permanent red color. The excess of bromine was removed by boiling, and to the solution was added 1.0 gm. of barium hydroxide crystals.

The mixture was refluxed for 15 minutes and then distilled. The distillate was made strongly alkaline with barium hydroxide and tested for acetol. On the other hand, 3 gm. of crystalline *o*-nitrobenzaldehyde were mixed with 5 gm. of crystalline ferrous sulfate, and to this mixture was added 75 cc. of concentrated ammonia water. The resulting solution was heated on a water bath for an hour. It was then distilled with a current of steam and several cc. of the distillate were added to the test solution for acetol, given above. The mixture was evaporated to a volume of 25 cc. After cooling, hydrochloric acid was added to distinct acidity, and the solution was then neutralized with sodium bicarbonate and filtered. The solution thus obtained showed a deep blue fluorescence even in diffused daylight, indicating the presence of thymine.

Quantitative Study of Purine and Pyrimidine Bases.

1. Determination of the Ratio Guanine: Ademine.

a) Quantitative Isolation of Guanine—0.245 gm. (I) and 0.350 gm. (II) of the sample—for this and all other following estimations a similar sample was always used—were respectively hydrolyzed with 10 cc. of 5 vol.-% sulfuric acid in a flask by refluxing at boiling water bath temperature for 2½ hours. Upon cooling, the hydrolyzed mixture was filtered in a centrifuge tube, and to this solution ammonia water was added first to neutrality then until a concentration of 2% was obtained, and allowed to stand overnight. The precipitated guanine was centrifuged and washed twice with 1% ammonia water. The filtrate and washings were set aside for adenine determination. The guanine precipitate was dissolved by the addition of a little sodium hydroxide solution and reprecipitated with acetic acid. Upon standing several hours, the precipitate was filtered through a glass-filter of known weight and after drying for 1½ hours at 110°, was weighed.

I): 0.0245 mg. guanine, 9.3% guanine.
II): 0.0300 „ „ , 8.5 „ „
Average. 8.9 „ „

Analysis of Guanine—Guanine precipitate was transferred into hydrochloride, which, after decolorizing with charcoal, was recrystallized from 5% hydrochloric acid and analyzed.

3.070 mg. substance: 6.60 cc. 0.01 *n* HCl.
$C_5H_5N_5O \cdot HCl \cdot 2H_2O$ Calculated. 31.3% N.
Found. 30.7 „ „

b) *Quantitative Isolation of Adenine*—The filtrate and washings from guanine precipitate were placed in a centrifuge tube, made slightly acid with sulfuric acid and hot saturated silver sulfate solution was added, when a white precipitate occurred, which, after standing in a cold dark place for an hour, was centrifuged. The precipitate of silver salt was washed twice with silver sulfate solution, then transferred quantitatively into a beaker and decomposed with hydrochloric acid by warming on a water bath. The filtrate from silver chloride was concentrated to a volume of 3 cc., made slightly alkaline with ammonia water, then saturated sodium picrate solution was added as long as the precipitate formed, and was put several times in an ice-box. Finally the precipitate was filtered through a glass-filter and, after drying at 110° for 2 hours, was weighed.

I):	0.0576 gm. adenine picrate, corresponding to	8.7%	yield of adenine.
II):	0.1020 „ „ „ , “	„ 10.7 „	„ „ „
	Average.	9.7 „	„ „ „

Analysis of Adenine—From adenine picrate was recovered free adenine according to the method of Barnett and Jones (1911). Adenine picrate was first dissolved in 10% ammonia water so as to obtain about a 0.5% solution. To this solution an ammoniac solution of silver chloride was added. The precipitated silver salt of adenine was converted into hydrochloride by treating with hydrochloric acid. To the hydrochloride solution copper sulfate and sodium sulfite solutions were added at boiling temperature, from which adenine cuprous salt separated out. After the decomposition of cuprous salt with hydrogen sulfide, free adenine was obtained, which then was converted into sulfate and analyzed.

3.112 mg. substance: 7.75 cc. 0.01 *n* HCl.
$(C_5H_5N_5)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$ Calculated. 35.0% N.
Found. 34.9 „ „

Thus it follows an approximate ratio of guanine: adenine = 1 : 1.

2. *Determination of the Ratio Purine-N: Total-N.*

a) *Amount of Total-N*—Two samples, I and II, each weighing 0.040 gm., were taken respecitvely together with 5 cc. of 5 vol.-% sulfuric acid into a flask and heated under a reflux condenser in a boiling water bath for 2½ hours. Upon cooling, the hydrolyzed mixture was filtered into a 25 cc. measuring flask and the latter filled up to the mark. Using 3 cc. of this solution, which comprises 3/25 of the original sample, nitrogen was twice estimated from which an average was taken.

I)	3 cc. solution:	4.42 cc.	0.01 n	HCl.
II)	„ „ :	4.43 „	„	„
	Average.	4.424 „	„	„

b) *Amount of Purine-N*—15 cc. of the solution remaining from the above experiment were transferred into a centrifuge tube and the solution, after slight acidification with sodium hydroxide solution, was treated with hot saturated silver sulfate solution. The precipitate of purine silver was centrifuged, washed twice with silver sulfate solution and finally decomposed with hydrochloric acid. The filtrate from silver chloride was poured quantitatively into a 25 cc. measuring flask and filled up to the mark. 5 cc. of this solution, corresponding to 3/25 of the original sample, were used for nitrogen determination and the duplicate results were averaged.

I)	5 cc. solution:	2.625 cc.	0.01 *n*	HCl.
II)	„ „ :	2.825 „	„	„
	Average.	2.725 „	„	„

Hence the ratio purine-N: total-N	Found.	60.2 in %.
Tetranucleotide (Yeast nucleic acid)	Calculated.	66.7 „ „

3. *Determination of the Ratio Purinenucleotide-P: Total-P.*

This experiment is based upon the fact that the phosphoric acid of purinenucleotide is easily split off when the nucleic acid is heated with 5% sulfuric acid for 2½ hours, while the phosphoric acid of pyrimidinenucleotides is not affected by this process.

a) *Total-P*—0.080 mg. of the sample, together with 10 cc. of 5 vol.-% sulfuric acid, were placed in a flask and the mixture was refluxed in a boiling water bath for $2\frac{1}{2}$ hours. Upon cooling, the content of the flask was filtered quantitatively into a 25 cc. measuring flask and the latter filled up to the mark. 4 cc. of this solution, which corresponded to 4/25 of the original sample, were analyzed for phosphorus in duplicate according to Pregl-Lieb's method. The test solution was measured into a microkjeldahl-flask and washed completely by heating with 0.5 cc. of conc. sulfuric acid with the occasional addition of conc. nitric acid and hydrogen peroxide solution. The clear colorless liquid in the flask was transferred carefully into a test tube, 5 cc. of a mixture of sulfuric and nitirc acid were added, and the whole solution made to a volume of 15 cc. with water. The mixture was immersed in a boiling water bath and to the hot solution 15 cc. of molybdate-sulfuric acid reagent were added, well mixed and allowed to stand overnight. The precipitated ammonium phosphomolybdate was filtered by means of a microfilter tube of known weight and the latter, after evacuation in a desiccator for half an hour, was weighed.

4 cc. solution: 69.04 mg. ammonium phosphomolybdate.
" " : 70.10 " " "
Average. 69.07 " " "

b) *Purinenucleotide-P*—Two portions, each measuring 8 cc. and therefore corresponding to 8/25 of the original sample, were taken separately from the remaining solution of the above determination into a centrifuge tube. A few drops of phenolphthalein indicator and 25% ammonia water were added until it became distinctly red. This colored solution was made just colorless by the addition of 0.1 *n* sulfuric acid, then treated with 5 cc. of magnesia mixture prepared according to Ishibashi's direction1)

---

1) 50 gm. of crystalline magnesium chloride and 100 gm. of ammonium chloride (the molar ratio of the latter to the former is 7.6) are dissolved together in water, and to this solution conc. ammonia water is added till the phenolphthalein added beforehand becomes distinctly red. After standing 2 or 3 days the solution is filtered, if necessary, and then dil. hydrochloric acid

(1929) and again made a red color by the dropping of 2.5% ammonia water, after which 3 cc. of 25% ammonia water were finally added, stirred and left for an hour. The precipitate of magnesium ammonium phosphate, thus formed, was centrifuged and dissolved in 5 cc. of 1*n* sulfuric acid. From the latter solution ammonium phosphomolybdate was precipitated in the manner described above, and weighed.

8 cc. solution: 73.53 mg. ammonium phosphomolybdate.
,, ,, : 73.15 ,, ,, ,,
Average. 73.34 ,, ,, ,,
Hence the ratio purinenucleotide-P : total-P Found. 53.9 in %.
Tetranucleotide (Yeast nucleic acid) Calculated. 53 ,, ,,

Comparative Test of Dissolubility in Acetic Acid.

The well defined nucleic acids, namely the yeast and thymonucleic acids, differ in dissolubility in acetic acid so much that the latter dissolves readily in conc. acetic acid, while the former does not. In this point the present nucleic acid behaves in a similar manner with the thymonucleic acid, so that the nucleic acid dissolved in sodium acetate solution does not separate out by the addition of a large excess of glacial acetic acid, as previously observed in the case of the purification procedure. For the purpose of demonstrating more clearly such varying solubilities in acetic acid of the above three nucleic acids, a series of comparative tests were performed employing five samples prepared as below, of which three were a simple and the other two a mixed preparation.

1) 10 mg. of yeast nucleic acid.
2) 5 mg. of yeast nucleic acid + 5 mg. of thymonucleic acid.
3) 2.5 mg. of yeast nucleic acid + 7.5 mg. of thymonucleic acid.
4) 10 mg. of thymonucleic acid.
5) 10 mg. of nucleic acid under investigation.

Each sample, weighing 10 mg., was placed in a test tube, dis-

---

is added to it just to decolorize the phenolphthalein. The solution is then diluted with water to one litre and its acidity is so adjusted that the pH value lies between 5 and 6. This is done without any difficalty by the aid of methyl red (pH = 4.4 – 6.3) or *p*-nitrophenol (pH = 5.0 – 7.9).

solved by the addition of 1 cc. of 5% sodium acetate solution and to each solution, 9 cc. of glacial acetic acid were added with stirring. The three samples of (1), (2), and (3), formed a precipitation immediately, while those of (4) and (5) remained quite clear without showing either turbidity or precipitation.

DISCUSSION.

The purification of the crude nucleic acid was accomplished by a modified method. As described in the first part of this paper, the crude product was first dissolved in 10% sodium acetate solution, then made strongly acid with glacial acetic acid and precipitated by the addition of copper chloride solution as a copper salt, whereby the copper nucleate alone separated out almost entirely, while the protein contamination was held in solution through the presence of a large excess of acetic acid. If it was otherwise precipitated, as in the ordinary manner simply from its sodium acetate solution, a protein substance happened more or less to be entangled in the precipitating nucleic acid, uniting either chemically or physically. In the present case, a single performance of the above purification process was found sufficient to cause the crude material to become entirely negative towards the biuret reaction and at the same time to raise its phosphorus content up to a satisfiable value, 9.04%. The pentose content was determined at 14.1%, which value is equal to about half of the theoretical value for tetranucleotide. The desoxyribonucleic acid or thymonucleic acid content, determined by the use of the color reaction of Feulgen, was 24.8%. This does not, however, necessarily signify that thymonucleic acid exists by itself in the original sample, occupying a quarter part of it. It is more likely, for reasons to be mentioned in the following, that the new substance is of such a constitution that some ribose nucleotides are replaced with desoxyribose nucleotides, which give rise to Feulgen's reaction. At present, the method of estimating thymonucleic acid does not stand upon the confirmed base of analytical studies of its chemical machinism and correspondingly an improved method of desoxyribose must be achieved in order to obtain a clear knowledge of the above analytical figure. As purine bases, guanine and adenine were isolated in a ratio of 1:1 and pyrimidine bases such as, thymine, cytosine, and uracil, were identified. The determination of the proportion of purine-N to total-N and that of purine-nucleotide-P to total-P gave 60.2% and 53.9% respectively, indicating that the present nucleic acid corresponds to a tetranucleotide otherwise an octanucleotide, if it were possible to exist, and neither penta- nor hexanucleotide.

The nucleic acid of tubercle bacilli, designated first by Ruppel as "tuberculinic acid," of which detailed study was made by Brown and Johnson, possessed 8.11% of phosphorus and 11.3% of nitrogen. It yielded, upon hydrolysis, a remarkable amount of levulinic acid, besides a small trace of furfural, and separated as pyrimidine bases, thymine and cytosine, but no uracil. These results, which accord exceedingly with those of thymonucleic acid, have led the authors to conclude that the tuberculinic acid is of an animal type. Later Coghill studied the nucleic acid of timothy grass hay bacillus, which is closely related in biological classification with tubercle bacillus, differing, however, from the latter in its non-pathogenic character. His sample contained 7.9% of phosphorus, 14.9% of nitrogen, and 20% of pentose and upon hydrolysis, it produced two pyrimidine bases, cytosine and uracil, but no thymine. In this case, therefore, a result corresponding entirely to that of a plant nucleic acid was obtained. In the following year he published the study of nucleic acid of diphtheria bacillus, in which he found 8.05% of phosphorus, 14.5% of nitrogen, 12.4–13.8% of pentose, and 24–29% of thymonucleic acid with a purified sample and further confirmed the presence of three pyrimidine bases, thymine, cytosine, and uracil. This indicated that the nucleic acid assumes a character as if it were a mixture of both animal and plant types, contrary to the former two cases. The results of the present study, however, agree fairly well with the last results of Coghill, showing that both nucleic acids may be identical or else closely resembling each other. Now in review of the investigations, referred to above, it is of great interest to note that the nucleic acid of tubercle bacilli is an animal type and that of timothy bacilli a plant type, and furthermore, that of diphtheria bacilli as well as the present typhoid bacilli of mice, a mixed type. A series of solubility tests pointed out, however, that the present nucleic acid is easily soluble in concentrated acetic acid, similar to the thymonucleic acid and quite contrary to the yeast nucleic acid. In addition to this, a simple demonstration was established that this nucleic acid can not be a mere mixture of the yeast and thymonucleic acids, since the mixture of both acids in various proportions are capable of being readily separated into each component by means of glacial acetic acid. Thus, it would be reasonable to conclude that the present nucleic acid is a special type of nucleic acid of an unknown nature, although further study is required to confirm that it is a definite compound. Notwithstanding this, the nucleic acid of the present bacillus should be placed together with that of diphtheria bacillus in a class independent of the other well defined nucleic acids. To elucidate the nature of this new substance, which offers an interesting problem in this line of bacterial chemistry, a further close investigation is desired in the future.

SUMMARY.

1. A crude nucleic acid was prepared from the typhoid bacillus of a mouse and purified by applying a suitable purification method introduced in this paper, through which a pure nucleic acid in a yield, corresponding to 1.6% of the original fat-freed bacillus, was obtained.

2. The pure preparation, free from a trace of biuret reaction, contained 14.48% of nitrogen and 9.03% of phosphorus. It gave not only the pentose reaction but also Feulgen's reaction, showing the coexistence of ribose and desoxyribose as a sugar component.

3. As a basic component, purine bases, such as guanine and adenine, were isolated in equimolecular proportions and pyrimidine bases, such as thymine, cytosine, and uracil, were identified.

4. Further, it was estimated that the proportion of purine-N to total-N was 60.2% and that of purinenucleotide-P to total-P, 53.9%, each value corresponding to that required for tetranucleotide.

5. All the analytical results obtained coincided well in every respect with those found in the case of diphtheria bacilli.

6. It was soluble in concentrated acetic acid, quite the same as thymonucleic acid.

7. The possibility of the existence of an unknown nucleic acid of a special type in bacteria has been suggested.

REFERENCES.

Barnett, G. D. and Jones, W. (1911): J. biol. chem., **9**, 93.
Brown, T. B. and Johnson, T. B. (1923): J. amer. chem. soc., **45**, 1823.
Coghill, R. D. (1931): J. biol. chem., **90**, 57.
Coghill, R. D. and Barnes, D. (1932): An. Soc. Espan. Quim., **30**, 208; Chem. Zentralbl., **1**, 3307.
Hoffman, W. S. (1927): J. biol. chem., **73**, 15.
Ishibashi, M. (1929): Memoirs Coll. sci. Kyoto Imp. Univ., (A) **12**, 30.
Johnson, T. B. and Brown, T. B. (1922): J. biol. chem., **54**, 721.
Mockeridge, F. A. (1924): Biochem. J., **18**, 150.
Ruppel, W. G. (1898–99): Z. physiol. chem., **26**, 218.
Schaffer, A. J., Folkoff, C. and Jones, S. B. (1922): Bull. of the Johns Hopkins Hospital, **33**, 151.
Widström, G. (1928): Biochem. Z., **199**, 298.
Youngburg, G. E. (1927): J. biol. chem., **73**, 602.

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

ÜBER DIE MIKRO-BESTIMMUNGSMETHODE DES LIPOIDPHOSPHORS NACH ALKALI-TITRATION.

VON

JOKITI KOYANAGI.

(*Aus dem Biochemischen Institut der Kumamoto Medizinischen Fakultät, Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.*)

(Eingegangen am 23. Juni 1938)

Die Iversen'sche Methode (1920), eine mikro-methodische Anwendung der Neumann'schen (1902), hat als Alkali-Titrationsmethode der geringen Quantität Phosphor verbreiteste Anwendung gefunden, aber wegen ihrer Unzweckmässigkeiten hat man sich Verbesserungen ausgedacht, denen sich auch die Takata'sche Methode (1937) anreiht. Um nun die Mikro-Bestimmung des Phosphors zum Zweck der Bestimmung des Phosphatides zweckmässig anzustellen, verwendete ich die Titrationsmethode, die mir dadurch einen verhältnismässig guten Erfolg brachte, dass ich mir Vorzüge anderer Authoren zum Muster nahm und dabei zugleich auch eigene Versuche anwendete.

Um Lipoidphosphor im Gewebe zu bestimmen, muss das Lipoid restlos und rein extrahiert und verascht werden, dann entsteht aus Lipoidphosphor Phosphorsäure und wird als Phosphor-Ammoniummolybdat gefällt, welches quantitativ entsteht, der Niederschlag durch Alkali gelöst, und aus der Menge des gebrauchten Alkalis die Phosphormenge bestimmt. So wird die Mikro-Bestimmungsmethode des Lipoid-Phosphors in folgenden 4 Vorgängen beschrieben: Extraktion, Veraschung, Niederschlagbildung sowie Waschung und Titration.

I. EXTRAKTION.

Um Lipoid aus dem Gewebe zu extrahieren, verwendete ich die Endo'sche Extraktionsmethode (1928), die folgenderweise erfolgreich ausgeführt wurde.

Das frische Gewebe (0,2 gr–1,0 gr) wägt man in einem Wägegläschen mit gereinigtem Schmirgel, gibt alles zusammen in einen Mörser und zerstört es durch Schmirgelung, setzt nun die Mischung von Äther und Alkohol (1:1) hinzu, lässt durch Schmirgelung extrahieren und giesst die obere Flüssigkeit in den Becher ab. Das wird mehrermals wiederholt, bis zuletzt auch der Rückstand mit der Mischung von Äther und Alkohol zusammen in den Becher abgewaschen wird. Der Becher wird dann auf einem Wasserbad bei 60°C 2 Minuten lang warm gehalten und der Extrakt nach Abkühlung in einen Messkolben (50 ccm oder 100 ccm) filtriert. Der Rückstand aber wird wiederholt mit der Mischung von Äther und Alkohol gewaschen, die Waschflüssigkeit zusammen in den Messkolben versetzt. Eine bestimmte Quantität von Äther-Alkohol-Extrakt (die 0,05 mg–0,3 mg Phosphor entsprechende Menge) gibt man in einen 100 ccm Kjeldalkolben und entfernt das Lösungsmittel, auf dem Wasserbad bei 60°C, vollständig durch Unterdruck. Wenn die Wassertropfen schwer zu entfernen sind, so setze man Alkohol hinzu, um die Entfernung vollkommen auszuführen. Bleibt der Wassergehalt noch irgendwie zurück, so emulgiert sich das Lipoid bei Wiederextraktion des Äthers, und dadurch wird die Filtration verhindert und es ist schwer zu vermeiden, dass der Verlust der Phosphormenge bedeutend gross wird. Der durch Unterdruckdestillation entstandene Rückstand wird nun mit wasserfreiem Äther, der durch Chlorcalcium und Metallnatrium entwässert ist, extrahiert und durch gereinigten Asbest in einen 100 ccm Meyerkolben filtriert. Kolben und Asbestfilter werden auch mit wasserfreiem Äther vollkommen gewaschen und in diesen Kolben versetzt. Diese gesamten Lösungsmittel werden aber bei niedriger Temperatur vertrieben.

II. VERASCHUNG.

Bauchmann (1924) hat die Bell-Doisy- und Bloor'sche Methode der Veraschung mittels Schwefelsäure und Salpetersäure nachgeprüft. Er hat nämlich, den 2–15%igen Verlust des Phosphors dabei bestätigend, statt der Salpetersäure 30%iges H_2O_2 verwendet und mit einer kleinen Flamme erhitzt, bis das dichte

Gas der schwefligen Säure den Kolben füllt. Gelingt es trotz der zweimal wiederholten Behandlung noch nicht befriedigend, so setzt er noch einige Tropfen H_2O_2 hinzu. Dieses Verfahren braucht auch nach meiner Erfahrung deswegen viel Übung, wie im Falle der Veraschung mittels der Schwefelsäure und Salpetersäure, weil bei schwacher Flamme zwar die Veraschung sehr schwer ist, aber bei stärkerer Flamme der umso grössere Verlust des Phosphors auftritt. Nach Hillebrand und Lundell[1] habe ich also die Veraschung bei 150°C, bei der höchsten Temperatur, die den Verlust des Phosphors nicht herbeiführt, ausgeführt, und zwar auf einem Sandbad.

Die Entstehung des Niederschlags von Ammoniumphosphormolybdat wird durch zurückbleibende H_2O_2 ein wenig bzw. vollständig verhindert. Zum erfolgreichen Vertreiben von H_2O_2 benutzte ich Kaliumpermanganat nämlich wenn man der veraschten Lösung Kaliumpermanganat hinzusetzt, so wird das Violett des Kaliumpermanganats entfärbt, es kehrt nach vollständiger Zerlegung des H_2O_2 wieder zurück. Das überschüssige Kaliumpermanganat wird durch tropfenweise Hinzusetzung von Alkohol sowie durch Erhitzung, der überschüssige Alkohol durch Erhitzung entfernt. Die Reaktion geschieht wie in den folgenden Formeln. $[5H_2O_2 + 4H_2SO_4 + 2KMnO_4 = 2KHSO_4 + 2MnSO_4 + 8H_2O + 5O_2.$ $2KMnO_4 + 3H_2SO_4 = 2MnSO_4 + K_2SO_4 + 3H_2O + 5[O].$ $C_2H_6O + 6[O] = 2CO_2 + 3H_2O].$

Durch überschüssiges Hinzusetzen von Kaliumpermanganat tritt in einigen Fällen braune Niederschlag des MnO_2 auf, der durch Hinzusetzen von Alkohol und durch Erhitzung verschwindet. Die umgewandelte Pyro- und Metaphosphorsäure wird durch Hinzusetzen von Wasser und durch Erhitzung zur Orthphosphor-

---

1) Hillebrand und Lundell (1921) behaupten, dass man Phosphaten in der Schwefelsäure unter 150° mit keinem Verlust des Phosphors erwärmen, während durch die Erwärmung bei 200°–260° bzw. durch lang andauernde Erwärmung über 150° und zwar unter erwähnten Temperaturen der bedeutende Verlust des Phosphors herbeigeführt wird, ein Verlust, der auf Verdampfung der der Phosphorsäure und Umwandlung zu Pyro- und Metaphosphorsäure zurückzuführen ist.

säure zurück gebracht. [$H_4P_2O_7 + H_2O = 2H_3PO_4$. $HPO_3 + H_2O = H_3PO_4$].

Die Ausführungsmethode der Veraschung ist folgende: Setzt man dem Lipoid im Meyerkolben 0,7 ccm konzentrierter Schwefelsäure hinzu und gibt man darauf 30%iges H_2O_2 tropfenweise, auf dem Wasserbad erwärmend, dazu, so wird die verkohlte und gebräunte Lösung leicht entfärbt. Auf dem Sandbad bei 150°C wird dann die Lösung, je nachdem was und wieviel sie ist, 1–3 Stunden lang erwärmt. Bräunt sich die Lösung indessen, so setzt man 1–2 Tropfen H_2O_2 hinzu. Weil aber die Einmengung des Wassers die Veraschung erschwert, tröpfle man langsam nach und nach, nämlich nur nach der gänzlichen Verdampfung des Wassers des vorher getröpfelten H_2O_2. Um die vollständige Veraschung zu erzielen, wenn die Lösung auch wasserklar ist, setze man ein Uhrglas auf den Kolben und mache die Flamme heftiger. Nach Abkühlung wäscht man das Uhrglas mit 1 ccm Wasser, setzt der Lösung 5%iges Kaliumpermanganat tropfenweise hinzu, und erwärmt sie auf dem Wasserbad. Nachdem man festgestellt hat, dass sie sich nicht mehr entfärbt, gibt man 1–2 Tropfen Alkohol dazu, macht sie farblos und setzt dann eine Weile die Erwärmung auf dem Wasserbad fort.

III. ENTSTEHUNG DES NIEDERSCHLAGS, PHOSPHORAMMONIUMMOLYBDATS UND WASCHUNG DES NIEDERSCHLAGS.

Die Phosphorsäure lässt in einer bestimmten Azidität mit einer geeigneten Menge Ammoniumnitrat und Ammoniummolybdat vollständig den Niederschlag des Ammoniumphosphormolybdats entstehen. Das Reagens dieses Niederschlags besteht nach Iversen'scher Methode (1920), einer mikro-methodisch verwandten Neumann'schen, aus 0,7 ccm konzentrierter Schwefelsäure, 4 ccm Wasser, 3 ccm Ammoniumnitrat (50 g/dl), 3 ccm $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (10 g/dl) und ist für 0,05–0,3 mg Phosphor geeignet. Die Übung macht die Trennung dieses Niederschlags mit einem gewöhnlichen Trichter und einem aschfreien Filterpapier leicht möglich, lässt 5–6 Stücke auf einmal filtrieren. Man kühlt das Waschwasser auf 0–5° ab, um Verlust des Niederschlags zu verhindern. Ich für mein Teil benutzte einen glattebenen Trichter, der 4 cm im

Durchmesser und eine Neigung von 60° hat, und liess ein dichtes aschfreies Filterpapier, das 7 cm im Durchmesser hat, festkleben; dabei verwendete ich besondere Sorgfalt auf das Festkleben der Grenze des einschichtigen und dreischichtigen Teils des Filterpapiers.

Nun nach der Veraschung gibt man in den Meyerkolben 3 ccm Wasser und 3 ccm Ammoniumnitrat, kocht auf dem Wasserbad, setzt 3 ccm vom schon erwärmten Ammoniummolybdat hinzu, schüttelt es, erwärmend auf dem Wasserbad, heftig 1–2 Minuten und lässt einen gelben Niederschlag gut genug entstehen. Nach Abkühlung wird derselbe filtriert. Kolben und Filter werden sorgfältig gewaschen. Der Trichter muss fortwährend mit kaltem Wasser angefüllt sein. Fängt der Niederschlag zu sinken an, so wäscht man den Rand des Filters stark. Wenn das Wasser auf etwa 200 ccm kommt, so schiebt man ein Lackmuspapier tief in den Schenkelteil des Trichters hinein. Wenn das Papier sich nicht rötet, so ist die Waschung beendet.

IV. TITRATION.

Der gelbe Niederschlag des gereinigten Ammoniumphosphormolybdats wird nun in dem zugesetzten Alkali von einer bestimmten Konzentration aufgelöst. Die überschüssige Menge des Alkalis wird mit der Säure titriert, und aus der zur Auflösung des gelben Niederschlags verbrauchten Menge des Alkalis wird die Phosphormenge abgezählt. Es gibt zwei Gleichungen, die den Reaktionsumstand zwischen Niederschlag und Alkali zeigen, sowie ein Faktor die Abzählung der Phosphormenge errechnen lässt; die beiden finden ausgedehnteste Anwendung. Die eine ist die Gleichung von Neumann (1902):

$$2(NH_4)_3PO_4\cdot 24MoO_3\cdot 4HNO_3+56NaOH=2Na_2HPO_4+24Na_2MoO_4 \\ +4NaNO_3+32H_2O+6NH_3$$

und die andere die Gleichung von Pemberton (1893):

$$2(NH_4)_3PO_4\cdot 24MoO_3+46NaOH=2(NH_4)_2HPO_4+(NH_4)_2MoO_4 \\ +23Na_2MoO_4+22H_2O$$

Nach der Neumann'schen Gleichung entsteht NH_3, während es bei Pemberton nicht der Fall ist. Aber ich habe nicht nur in der Tat durch Hinzusetzung von $N/25$ NaOH die Entstehung des NH_3 bestätigt, sondern auch bei der Abmessung des KH_2PO_4, wie sie nachher erwähnt wird, durch den Neumann'schen Faktor (0,0443) stimmt der experimentierte Wert zwar mit dem theoretischen Wert überein, aber durch den Pemberton'schen Faktor (0,0539) beträgt der exp. Wert etwa 20% mehr als der theoretische Wert. Darum habe ich nach Neumann'schen Gleichung weiter experimentiert, und die kleine Menge Ammoniak, die aus der Wirkung von Ammoniumphosphormolybdat und Alkali entsteht, löst sich im Wasser auf, und daraus entsteht folgendes Gleichgewicht:

$$NH_3 + H_2O \rightleftarrows NH_4OH \quad (1), \qquad NH_4OH \rightleftarrows NH_4^{\cdot} + OH' \quad (2)$$

Ist aber Alkali zu überschüssig hinzugesetzt worden, und vermehrt sich also in der (2) Reaktion OH', folglich NH_4OH, schreitet die (1) Reaktion nach links fort, und ein Teil des Ammoniaks befreit sich ohne erwärmt zu werden.

Aber der grösste Teil des Ammoniaks, das in dem Alkali einer bestimmten Konzentration eingemengt ist, ist freilich bei der Neutralisierung mit der Säure hinderlich. Also muss dieses Ammoniak im voraus vertrieben sein. Iversen hatte wie Neumann die Kochmethode vorgezogen, aber ich benutzte dabei wie Bang Formalin mit sicherem Erfolg. Warum habe ich zum Vertreiben des Ammoniaks Iversen'sche Methode vermieden? Iversen (1920) tröpfelt in den Niederschlag des Ammoniumphosphormolybdats $N/25$ NaOH ab. Nach dem Verschwinden des Gelb im Niederschlag gibt er noch 2 ccm NaOH überschüssig und dann Wasser dazu, bis die Gesamtmenge 50 ccm beträgt, die dann durch Kochen auf 20 ccm konzentriert wird. Die Lösung wird mittels Phenolphthalein als Indikator mit $N/25$ H_2SO_4 titriert und noch 0,4 ccm überschüssig hinzugesetzt. Er kocht es einige Minuten, vertreibt dadurch das während der Konzentration resorbierte Kohlensäuregas, lässt abkühlen und titriert wieder mit $N/25$ NaOH. Neutralisiert man die Lösung mit $N/25$ N_2SO_4, setzt noch 0,4 ccm überschüssig hinzu und kocht, so rötet sich das Phenolphthalein durch die allmähliche Verlängerung der Kochendauer, wodurch aber die notwendige Ergänzung des $N/25$ H_2SO_4 herbeigeführt wird. Die Menge der dabei hinzugesetzten $N/25$ H_2SO_4 steht im geraden Verhältnis zur Kochdauer. Je länger das Kochen dauert, desto näher steht der experimentierte Wert des Phosphors zum theoretischen Wert, wie aus der Tabelle zu ersehen ist.

Menge des geprüften Phosphors (mg)	Kochdauer (im Becher auf dem Wasserbad)	Exp. Wert (mg)
0,062	5 Minuten	0,138
„	bis zu $\frac{2}{3}$ konzentriert wird	0,128
„	bis zu $\frac{1}{3}$ konzentriert wird	0,084
„	bis zu $\frac{1}{5}$ konzentriert wird	0,069

Also mit gutem Erfolg hat Takata (1936) die Lösung bis zur Trocknung gekocht, aber ich habe diese Methode vermieden, weil sie eine zu lange Zeit beansprucht.

Aus der Verbindung des Formalins mit dem Ammoniak entsteht ganz leicht Hexamethylentetramin ($6CH_2O+4NH_3=N_4(CH_2)_6+6H_2O$). So habe ich denn zu jeder folgenderweise bedingten Lösung 10 ccm Wasser gegeben, Phenolphthalein als Indikator benutzend, mit $N/25$ H_2SO_4 titriert und folgendes Ergebnis erzichlt.

	$N/25$ NH_3 (ccm)	Alkalisches Formalin (ccm)	$N/25$ NaOH (ccm)	$N/25$ N_2SO_4 (ccm)
1	0	5,0	0	0,68
	1,0	„	0	„
2	0	„	1,0	1,68
	1,0	„	„	„

Dadurch hat sich ergeben, dass die Neutralisierung mit derselben Titrationsmenge der Säure ganz unabhängig vom Vorhandensein des Ammoniaks auftritt, d. h. in der alkalischen Reaktion verbindet sich Ammoniak sogleich mit Formalin und das dadurch entstandene Hexamethylentetramin bleibt in der alkalischen Flüssigkeit beständig und bei der Titration gar nicht hinderlich. Bei der Mikro-Bestimmung braucht die Menge des Formalins, das zum Verschwinden des aus Ammoniumphosphormolybdat entstandenen Ammoniaks verbraucht wird, zwar theoretisch nicht viel zu sein, aber ich habe meinerseits eine Überschussmenge gebraucht, um die Reaktion sobald wie möglich auftreten zu lassen.

Wird das Kohlensäuregas in der Natronlauge resorbiert und in der Lösung als Natriumcarbonat eingemengt, so entsteht dabei folgende Reaktion, wo die Lösung bei der Titration mit Säure Phenolphthalein als Indikator gebraucht, gerade farblos wird. $NaOH + Na_2CO_3 + H_2SO_4 = NaHCO_3 + H_2O + Na_2SO_4$.

Phenolphthalein rötet sich in Na_2CO_3-Lösung und bleibt in der $NaHCO_3$-Lösung farblos. Also in der obigen Reaktion ist die Säure weniger verbraucht, als im Falle vom NaOH und Säure, darum steht bei geringere Phosphormenge häufiger der experimentierte Wert noch höher als der theoretische. Also beim Verfahren der Titration berücksichtige man, dass die Lösung die Atmungsluft oder andere Kohlensäuregase nicht resorbiert. Dabei hat man auch, wie unten erwähnt wird, einen Blindversuch angestellt, 1) damit man den Alkaligehalt im Formalin feststellen kann, weil man wegen der Herstellungsschwierigkeit des genau neutralen Formalins, Formalin von irgendeiner Alkalität benutzt, 2) damit man prüft, ob der Phosphor denn im Reagens zum Niederschlag enthalten ist, 3) damit man nachweist, ob die Entfernung der am Filterpapier adsorbierten Schwefelsäure vollständig ausgeführt ist, und 4) sowohl weil die Kohlensäuregas nicht enthaltende, *N*/25 NaOH schwer herzustellen ist, als auch weil die Resorption des Kohlensäuregases in *N*/25 NaOH in der Titrationsbehandlung ganz schwer zu vermeiden ist.

Die Titration ist folgenderweise ausgeführt: Das Filterpapier, das den gelben Niederschlag filtriert hat, wird nach dessen Waschung mit einer Pinzette beseitigt und in einen Becher (50 ccm) gegeben, nachdem der Niederschlag auf dem Trichter mit dem Filter weggeputzt worden ist. Indem man das Papier schlammig zermalmt, setzt man *N*/25 NaOH, das Kohlensäuregas nicht enthält, hinzu, (beim Gebrauch verdünne man N-NaOH) und gibt noch 1,0 ccm überschüssig, nachdem das Gelb des Niederschlags verschwunden ist. (Die Verbrauchsmenge sei a ccm) Gleich darauf setzt man 5,0 ccm alkalischen Formalins hinzu, (man bereite Formalin, das bei Phenolphthalein als Indikator durch Abtropfen des N-NaOH schwach rötlich gefärbt wird,) rührt es gut genug um und titriert es mit $N/25$ H_2SO_4. Der Augenblick, wo sich das Rot der Lösung vollständig entfärbt, sei die Endreaktion. (Die Verbrauchsmenge sei b ccm).

Beim Blindversuch verfährt man in gleicher Weise wie beim obigen Experiment. Das Filterpapier, das das bei der Entstehung des Niederschlags verwendete Reagens filtriert hat, wird nach Waschung in einen Becher versetzt. Dann gibt man 10 ccm Wasser darein, setzt nach Zermalmung 1 gtt Phenolphthalein hinzu, und titriert mit $N/25$ NaOH. Nachdem sich die Lösung schwach rötet, gibt man 1,0 ccm überschüssig dazu. (Die Verbrauchsmenge sei c ccm) Gleich darauf setzt man 5,0 ccm alkalischen Formalins hinzu und titriert es nach Umrühren mit $N/25$ H_2SO_4. (Die Verbrauchsmenge sei d ccm).

Rechnung: Rechnet man aus der schon erwähnten Neumann'schen Gleichung den theoretischen Faktor zur Phosphormenge, so beträgt die 1,0 ccm $N/25$ NaOH entsprechende Phosphormenge 0,0443 mg, aus dessen Multiplikation mit der Konsummenge des $N/25$ NaOH ist also die Phosphormenge zu finden. $0{,}0443 \times \{(a-c)-(b-d)\}$mg.

Beispiele: 0,0351 g KH_2PO_4 wirde 100 ccm Wasser aufgelöst, die verschiedene gewisse Menge (0,08, 0,16, 0,24 und 0,32 mg davon Phosphor entsprechende) abpipettiert und ohne Veraschung der Phosphor bestimmt. Das Resultat ist: Für den errechneten Wert war der höchste 104,0%, der mindeste 99,0%, Mittelwert 100,6%. Eine 0,08 und 0,16 mg Phosphor entsprechende Menge der Phosphatlösung wurde genommen und verdampft, darauf 1 Tropfen Olivenöl zugefügt und verascht, und der P bestimmt. Das Resultat: Der höchste Wert 103,0%, der mindeste 101,0%, Mittelwert 102%.

Lipoid-P der Gewebe des Kaninchens wurde bestimmt. Das Resultat ist folgendes.

	Gewicht d. Gewebes (g)*	Gebrauchte Menge $N/25$ NaOH (ccm)	Phosphormenge (mg)	Phosphormenge des Gewebes (%)
Leber	i) 0,12	3,77	0,161	0,139
	0,12	3,86	0,171	0,143
	ii) 0,25	7,81	0,346	0,138
	0,25	7,93	0,351	0,140
Niere	i) 0,14	2,60	0,115	0,082
	0,14	2,82	0,125	0,089
	ii) 0,28	5,13	0,227	0,081
	0,28	5,16	0,229	0,082

* Alkohol-Äther (1:1)-Extrakt der gewissen Menge des Gewebes wurde zu 100 ccm aufgefüllt, davon eine bestimmte Menge genommen und aus deren Menge Gewicht des Gewebes umgerechnet.

ZUSAMMENFASSUNG.

Der Umriss der Ausführungsweise wird zusammengefasst wie folgt:

Das Lipoid aus dem Gewebe wird nach Endo'scher Methode mit Äther-Alkohol (1:1) unter Schmirgelung extrahiert. Bei Veraschung des Äther-Alkohol-Extrakt werden also nach Bauchmann konzentrierte Schwefelsäure und 30%iges H_2O_2 verwendet. Die Veraschungstemperatur ist nach Hillebrand 150°, bei welcher ein Verlust des Phosphors nicht entsteht. Man gibt also eine bestimmte Menge Äther-Alkohol-Extrakt des frischen Gewebes (Phosphor 0,05 mg—0,3 mg) in einen 100 ccm Kjeldahlkolben und entfernt das Lösungsmittel durch Unterdruck. Wassertropfen werden mit Absolutalkohol vollständig entfernt. Dann extrahiert man mit wasserfreiem Äther, filtriert durch Asbest in einen 100 ccm Meyerkolben und vertreibt den Äther. Man setzt 0,7 ccm konzentrierter Schwefelsäure hinzu, erwärmt auf dem Wasserbad und entfärbt mit Zutröpfeln von 30%igen H_2O_2. Erwärmt auf dem Sandbad bei 150° 1–3 Stunden, je nachdem was und wieviel die geprüfte Substanz ist. Bräunt sich die Lösung indessen, so setzt man 1–2 Tropfen H_2O_2 hinzu. Endlich setzt man eine Uhrschale auf den Kolben und erhitzt so lange, bis sich SO_2 entwickelt. Man wäscht die Uhrschale mit 1 ccm Wasser, tröpfelt 5%iges $KMnO_4$ ab, bis die Lösung violette Färbung zeigt, und erwärmt auf dem Wasserbad. Um den Überschuss der $KMnO_4$ zu zersetzen, tröpfelt man Alkohol dazu und erwärmt die Lösung, bis sie sich wasserklar entfärbt, der Alkohol wird durch Erwärmung entfernt (Lösung A).

Dann fällt man nach Iversen'scher Methode den Phosphor als Ammoniumphosphormolybdat, worauf man den Niederschlag in Alkali von einer gewissen Konzentration auflöst, und aus der Konsummenge des Alkalis wird die Phosphormenge abgezählt. Gleichungen, die den Faktor für die Abzählung des Phosphors ergeben, gibt es zwei, die Neumann'sche und Pemberton'sche, die allgemein weit und breit verwendet sind. Ich ziehe die Neumann'sche Gleichung wegen ihrer Gültigkeit vor. Um Ammoniak, ein Reaktionsergebnis des Ammoniumphosphormolybdats und der Natronlauge, zu vertreiben, verwende ich, wie Bang, Formalin mit gutem Erfolg. Also der Lösung A setzt man 3 ccm Wasser und 3 ccm von 50 g/dl $(NH_4)NO_3$ hinzu, kocht die Lösung im Wasserbad, setzt noch 3 ccm vom schon erwärmten 10 g/dl $(NH_4)_6MO_7O_{24}{\cdot}4H_2O$ hinzu und schüttelt sie heftig 1–2 Minuten. Nach Abkühlung filtriert man den Niederschlag ab, wäscht mit ca. 200 ccm kalten Wassers unter 5°C. Darauf versetzt man das Filterpapier mit dem Niederschlag in einen 50 ccm Becher und titriert ihn mit $N/25$ NaOH unter dessen Zermalmung. Nach gänzlichem Verschwinden des Gelb des Niederschlages giesst man 1 ccm überschüssig dazu. (Die Verbrauchsmenge sei a ccm) Daneben wird ein Blindversuch angestellt, die Verbrauchsmenge sei c ccm. Gleich darauf setzt man 5,0 ccm alkalischen Formalins hinzu, rührt gut um, setzt 10 ccm Wasser und 1 Tropfen vom 1%igen Phenolphthalein hinzu, titriert mit $N/25$ H_2SO_4. Der Augenblick, wo das Rot gänzlich verschwindet, gilt als Endreaktion. Diese Verbrauchsmenge sei b ccm. Die beim Blindversuch sei d ccm. Dann ist der Lipoidphosphor im frischen Gewebe prozentuell aus der folgenden Formel zu finden:

$$\frac{0{,}0443\times\{(a-c)-(b-d)\}\times 100}{\text{Verbrauchsmenge des Gewebes (mg)}}$$

LITERATUR.

Bang (1911): Biochem. Z., **32**, 443.
Bauchmann (1924): J. biol. Chem., **59**, 667.
Endo (1928): J. of Juzen Med. Soc., **33**, 1892.
Hillebrand u. Lundell (1921): Chem. Zentralbl., **2**, 535.
Iversen (1920): Biochem. Z., **104**, 22.
Neumann (1902): Z. f. Physiol. Chem., **37**, 115.
Pemberton (1893): J. of American Chem. Soc., **15**, 382.
Takata (1936): J. of Biochem., **24**, 153.

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

STUDIES ON TYROSINASE.

III. The effect of the addition of various salts on the potato tyrosinase.

By

OSAMU KAWASAKI.

(From the Sixth Research Division (Biochemistry) of the Institute for Infectious Diseases, Tokyo Imperial University. Head of the Division: Assistant Prof. T. Uchino.)

(Received for publication, June 25, 1938)

Introduction.

Nobutani (1936) has recently examined the action of potato tyrosinase on various phenol derivatives, both by comparison of colour changes of the reaction mixtures and by measuring their oxygen uptake using Warburg's apparatus. He found that the presence of a series of amino acids and some aromatic amino compounds such as aniline and its derivatives greatly accelerates the pigment formation and also brings about the marked increase of the rate of oxygen consumption. The present investigation was carried out in continuation of this research and deals with the effect of the addition of a number of metallic salts on the tyrosinase activity. As regards the influence of inorganic salts it was pointed out by Pugh (1932) that ferrous salt accelerates the action of tyrosinase.

Tamai (1935) has studied the effect of the addition of various salts on peroxydase, using three enzyme preparations of different purities obtained in the course of purification. To gain some idea of the nature of the enzyme in question, it is desirable, as Tamai pointed out, to compare the behaviour of the enzyme preparations of varying degree of purity.

In this experiment an attempt was therefore made to purify the potato tyrosinase successively by precipitation with alcohol, by adsorption with aluminium hydroxide suspension C_r and by electrodialysis. By use of the preparations of different purities thus obtained the influence of the addition of a series of inorganic salts especially those of heavy metals was examined. The results obtained are given in the following sections.

PREPARATION OF THE POTATO TYROSINASE.

The preparation of the enzyme from potato was effected mainly by the method described by Graubard and Nelson (1935).

Potatos were washed and the peripheral portion was comminuted by means of a porcelain grater. The macerated potato substance was then strained through silken cloth. After the removal of the starch by centrifugation the juice was cooled to −10° and mixed with twice its volume of alcohol, also precooled to −10°. The precipitate formed was filtered through infusorial earth and taken up in water equal to the original volume of juice. After the addition of 1 gm. of secondary sodium phosphate per 100 cc. of water the mixture was stirred well and filtered after an hour. The filtrate was then dialyzed for 48 hours against distilled water in an ice chamber, the water being changed twice a day. The enzyme solution thus obtained was kept in an ice chamber with toluene and used for experiments as "dialyzed enzyme preparation."

To the dialyzed enzyme solution was then added one-third its volume of aluminium hydroxide suspension C_r. The mixture, its pH being usually around 6.0, was stirred and centrifuged. The supernatant liquid was tested and was found to contain no tyrosinase. The precipitate was taken up in water equal to one-half the original volume of the enzyme solution and 1 gm. of secondary sodium phosphate per 100 cc. was added. The mixture which showed a pH round 8.0 was stirred and filtered after an hour. The filtrate was then dialyzed in the same manner as mentioned above. The enzyme solution thus prepared was kept in an ice chamber with toluene and used for experiments as "alumina preparation."

An attempt was then made to effect a further purification of the alumina preparation by means of electrodialysis, using Pauli's electrodialysor. A last trace of salts was thus freed from the enzyme solution, its conductivity being decreased nearly to that of distilled water. The preparation thus obtained was used for experiments as "electrodialysant."

EXPERIMENTAL PROCEDURE.

The experimental details were exactly the same as those described by Nobutani (1936). Warburg's apparatus was employed to measure the oxygen uptake. The vessels used were of about 27–28 cc. capacity with a central compartment, into which 0.5 cc. of 5 per cent KOH solution was introduced to absorb CO_2 produced, and with a side chamber which serves as a reservoir for the tyrosinase solution. Into the main compartment the solution of *p*-cresol as substrate, buffer solution, etc., were introduced. Phosphate mixture was used as buffer and at reactions more alkaline than pH 10 the mixture of disodium phosphate and sodium hydroxide solution according to Ringer was used, the concentration of the phosphate being kept constant. The total volume of the reaction mixture in the main compartment was always made up to 5.5 cc. and accordingly that in the whole vessel 6.0 cc. The gas space was filled with oxygen. The temperature of the thermostat was maintained at 25° unless otherwise stated. After the equilibration of the pressure was attained the tyrosinase was added to the mixture in the main compartment by turning the side chamber. The readings of the manometer were then taken at intervals of 10 minutes.

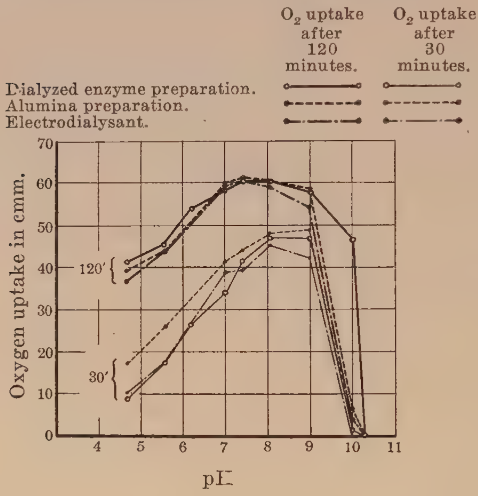
EXPERIMENTAL RESULT.

I. The influence of pH on the action of tyrosinase.

A. Optimum pH for the action of tyrosinase. We examined at first the optimum pH for the action of tyrosinase, using enzyme preparations of three different purities, i.e., dialyzed enzyme preparation, alumina preparation and electrodialysant. The results obtained are shown in Fig. 1, where the ordinate denotes oxygen uptake in cmm. (0°, 760 mm. Hg) after 30 and 120 minutes respectively and the abscissa pH of the reaction mixtures.

Fig. 1.

Action of the three tyrosinase preparations on *p*-cresol at various pH.
0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 3.0 cc. *M*/10 phosphate buffer + 1.5 cc.
distilled water + 0.5 cc. tyrosinase solution.
Temp. = 25°.



As will be seen from the figure the tyrosinase shows a comparatively wide range of optimum pH between pH 7 and 9. The successive purification of the enzyme by adsorption with aluminium hydroxide suspension C_r and electrodialysis brings about no appreciable change of the optimum pH. As the absorption of 18.63 cmm. oxygen (0°, 760 mm. Hg) corresponds to one atom of oxygen per molecule of *p*-cresol, 3 atoms are taken up at the optimum range of pH. At pH 4–5 about 2 atoms of oxygen are absorbed, after which no further oxygen consumption can be recognized. It must be noted also that the pH-activity curves show a sudden break at pH 9–10. This break is due to the destruction of enzyme in alkaline medium, as will be shown in the following section.

B. *Behaviour of tyrosinase against acid and alkali.* To examine the behaviour of tyrosinase against acid and alkali 4 cc. each of the alumina preparations were added with 3 cc. acid, neutral or alkaline buffer solutions, and the mixtures were shaken in the usual manner at 25° and in the gas medium of oxygen. After

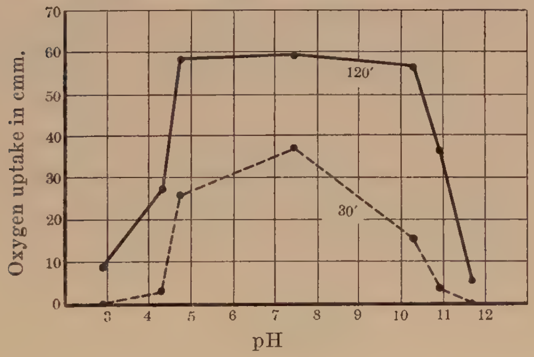
120 minutes' shaking the mixtures were neutralized and the whole volume made up to 8 cc. with water. 1 cc. each of these solutions was then tested for the tyrosinase activity at pH 7.38 as usual. Fig. 2 shows the oxygen uptake after 30 and 120 minutes. The abscissa in the figure represents pH of the buffer solutions, with which the tyrosinase was treated previously.

Fig. 2.

Behaviour of tyrosinase (alumina preparation) against acid and alkali.

0.5 cc. $M/300$ *p*-cresol + 3.0 cc. $M/10$ phosphate buffer + 1.0 cc. distilled water + 1.0 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25°. pH = 7.38.



The results in Fig. 2 show that at reactions more alkaline than pH 11 or more acid than pH 4 the tyrosinase rapidly loses its activity.

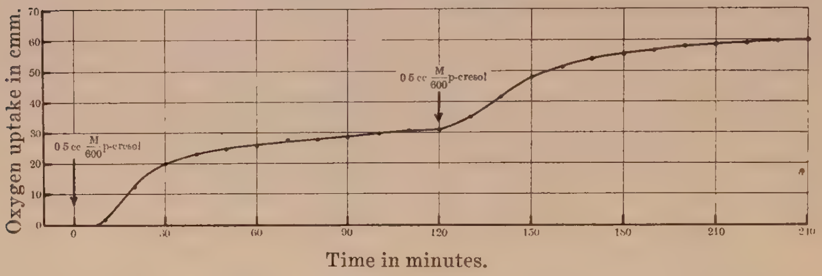
C. A further experiment, demonstrating that the tyrosinase retains its full activity for several hours in our experimental conditions, was accomplished as follows. The tyrosinase (alumina preparations) was added from a side chamber to the mixture containing only half the usual amount of substrate, e.g., 0.5 cc. $M/600$ *p*-cresol solution, and after 120 minutes' shaking the second half of the substrate was introduced from a second side chamber, the shaking being then continued as before. The oxygen uptake in the whole course of this experiment is given in Fig. 3.

Fig. 3 shows us clearly that upon subsequent addition of *p*-

Fig. 3.

0.5 cc. $M/600$ *p*-cresol + 3.0 cc. $M/10$ phosphate buffer + 1.0 cc. distilled water + 0.5 cc. tyrosinase solution + 0.5 cc. $M/600$ *p*-cresol.

Temp. = 25°. pH = 7.38.



cresol after 120 minutes' shaking the oxygen is taken up in exactly the same manner as before.

II. *Optimum temperature for the action of tyrosinase.*

The temperature of the thermostat was varied at 20°, 25°, 30°, 35°, 40° and 45° and the optimum temperature for the action of tyrosinase was examined, the pH of the reaction mixtures being buffered at 7.38.

It is clear from Fig. 4_{a-b} that the optimum temperature for the tyrosinase action lies between 35–40°.

III. *Effects of the addition of various salts on the tyrosinase action.*

A. Experiments with alumina preparation. Various kinds of inorganic salts such as KCN, LiCl, KCl, KCNS, $NaNO_2$, NH_4Cl, $NaNO_3$, NaF, $Na_2S_2O_3$, $Na_4P_2O_7$, $AgNO_3$, $HgCl_2$, $MnCl_2$, $ZnSO_4$, $CuSO_4$, $CdCl_2$, $MgCl_2$, $CaCl_2$, $BaCl_2$, $CuCl_2$, $Pb(NO_3)_2$, $CoCl_2$, $CoSO_4$, $NiSO_4$, $FeSO_4$, $FeCl_3$, $AlCl_3$, $Cr_2(SO_4)_3$, $Th(NO_3)_4$, $K_4Fe(CN)_6$, $K_3Fe(CN)_6$, K_3AsO_4, $KMnO_4$, ferrous ammonium sulphate, potassium tartarate, sodium oxalate and sodium citrate were added to the tyrosinase system at varying concentrations and their influence on the activity of tyrosinase was examined. We

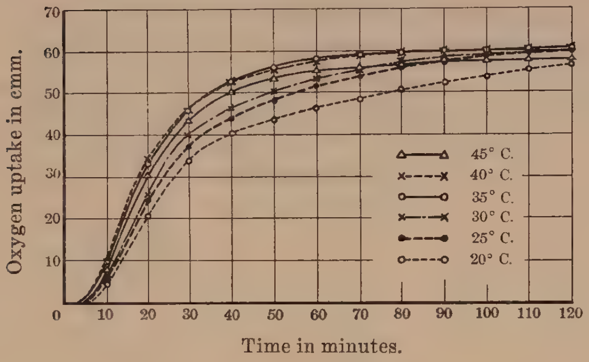
Fig. 4.

Action of tyrosinase at various temperature.

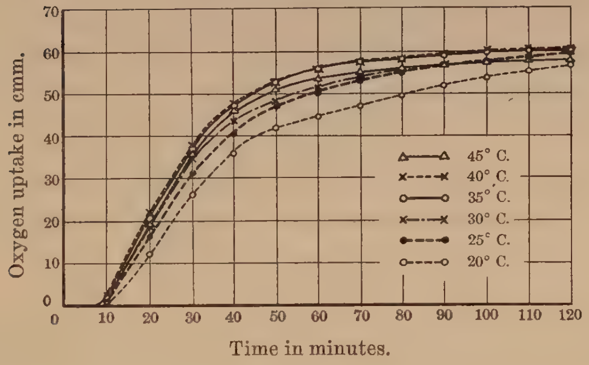
0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 3.0 cc. *M*/10 phosphate buffer + 1.5 cc. distilled water + 0.5 cc. tyrosinase solution.

pH = 7.38.

a. Alumina preparation.



b. Electrodialysant.



used at first the alumina preparations and the experiments were carried out at pH 7.38 and at 25°.

Among the salts mentioned above KCN, $AgNO_3$, $HgCl_2$, $MnCl_2$, $K_3Fe(CN)_6$ and $KMnO_4$, were found to inhibit the tyrosinase, while $FeSO_4$, $K_4Fe(CN)_6$ and $FeSO_4(NH_4)_2SO_4$ bring about its activation. The effects of these salts are summarized in Fig. 5.

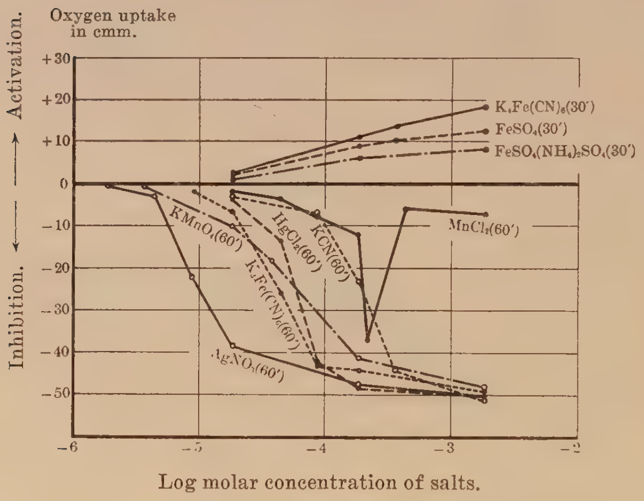
As the amount of salt solutions employed was 1 cc., and the whole volume of the reaction mixture was always made up to 5.5 cc., the final concentration of salts was diluted 5.5 times. In Fig. 5 are shown the activation or inhibition of oxygen uptake, after 30 and 60 minutes respectively, as compared with the control experiment without salts.

Fig. 5.

Effect of various salts on the tyrosinase activity (alumina preparation).

0.5 cc. $M/300$ *p*-cresol + 3.0 cc. $M/10$ phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. salt solution + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25°. pH = 7.38.



The effect of $MnCl_2$ is to be particularly noted. It causes a marked depression of oxygen uptake at a certain concentration, e.g., at 1/4400 mol. At higher or lower concentrations than this the inhibitory action can only be slightly observed. Salts of chromium, nickel and cobalt did not show any such effect as that of manganese salt.

Ferrous salts, such as ferrous sulphate, potassium ferrocyanide and ferrous ammonium sulphate, accelerate tyrosinase, the activation being most remarkable in the first 30 or 40 minutes, while, on the contrary, ferric salt, such as potassium ferricyanide, inhibits it. Ferric chlorid, however, exerts no effect on tyrosinase.

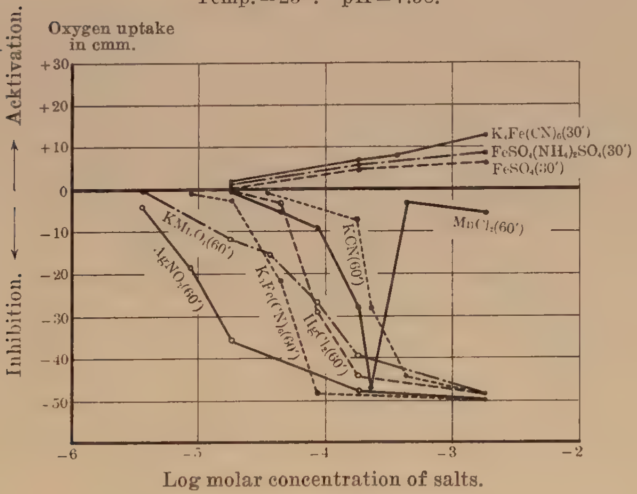
B. Experiments with electrodialysant. The effects of the same salts as shown in Fig. 5 were then examined, using electrodialysant in place of alumina preparations. The results obtained are given in Fig. 6.

Fig. 6.

Effect of various salts on the tyrosinase activity (electrodialysant).

0.5 cc. $M/300$ p-cresol + 3.0 cc. $M/10$ phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. salt solution + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25°. pH = 7.38.



It can be seen from Fig. 6 that no essential difference is noted between the experiments with alumina preparations and with electrodialysant.

C. The effects of the addition of salts at varying pH. The foregoing experiments A. and B. were carried out at pH 7.38 alone. In order to decide whether or not the promoting or inhibiting action of salt is influenced by pH of the medium, the effects of KCN, $AgNO_3$, $HgCl_2$, $MnCl_2$, $K_3Fe(CN)_6$, $KMnO_4$, $FeSO_4$,

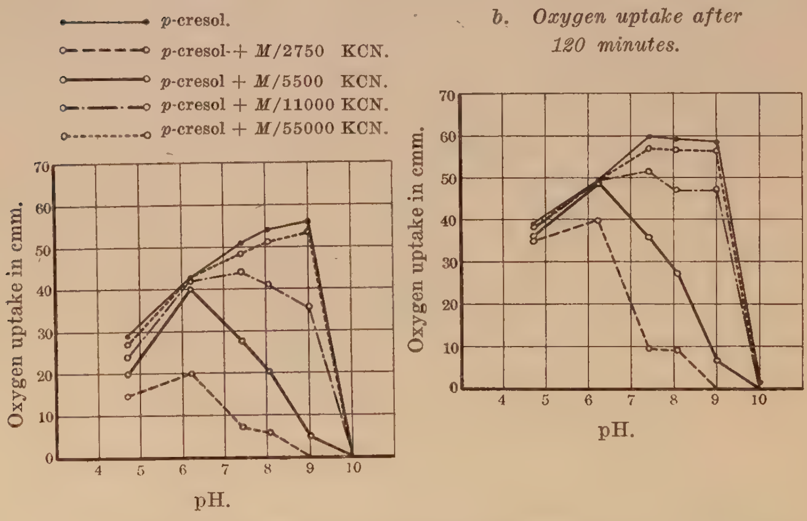
$K_4Fe(CN)_6$ and $FeSO_4(NH_4)_2SO_4$ were examined at varying pH of the reaction mixtures as well as at varying concentrations of salts. The results obtained are shown in Fig. 7–14. For the purpose of comparison the activity-pH curves without salts are also given in each figure.

Fig. 7.

Effect of KCN on the tyrosinase activity (alumina preparation) at varying pH.

0.5 cc. $M/300$ *p*-cresol + 3.0 cc. $M/10$ phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. salt solution + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25°.



a. Oxygen uptake after 60 minutes.

b. Oxygen uptake after 120 minutes.

It is clear from Fig. 7 that the inhibition of tyrosinase by KCN takes place only at the alkaline side and accordingly the optimum pH is shifted to the acid side. On the contrary $FeSO_4$, $K_4Fe(CN)_6$ and $FeSO_4(NH_4)_2SO_4$ activate the enzyme mainly at the acid side. As $MnCl_2$ behaves in a peculiar way towards tyrosinase, causing a maximum inhibition at a definite concentration, its effect is demonstrated in Fig. 15a–f, in which the abscissa

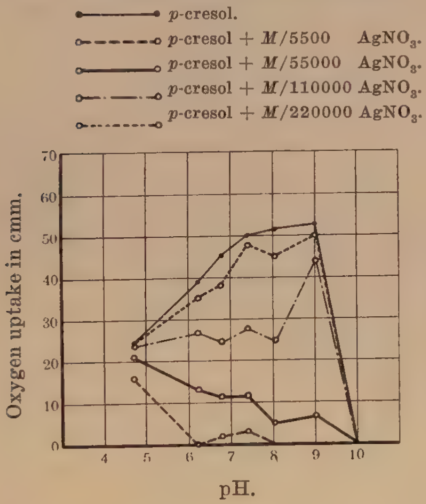
Fig. 8.

Effect of $AgNO_3$ on the tyrosinase activity (alumina preparation) at varying pH.

0.5 cc. M/300 p-cresol + 3.0 cc. M/10 phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. salt solution + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25°.

a. Oxygen uptake after 60 minutes.



b. Oxygen uptake after 120 minutes.

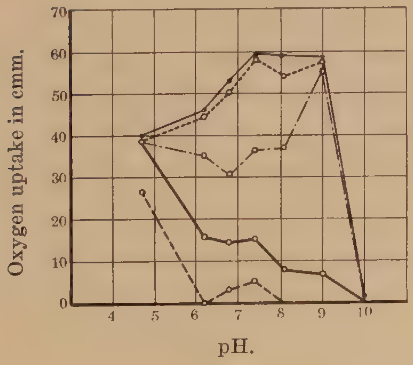


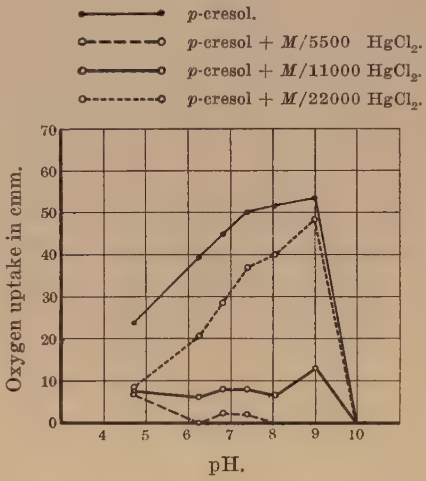
Fig. 9.

Effect of $HgCl_2$ on the tyrosinase activity (alumina preparation) at varying pH.

0.5 cc. M/300 p-cresol + 3.0 cc. M/10 phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. salt solution + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25°.

a. Oxygen uptake after 60 minutes.



b. Oxygen uptake after 120 minutes.

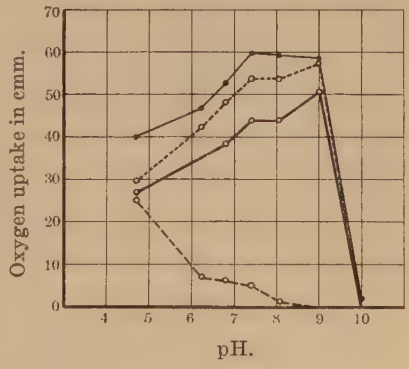


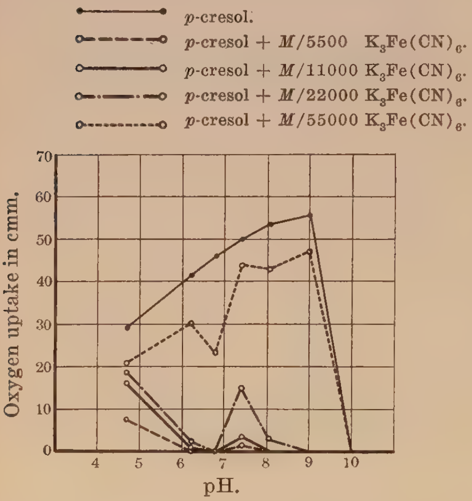
Fig. 10.

Effect of $K_3Fe(CN)_6$ on the tyrosinase activity (alumina preparation) at varying pH.

0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 3.0 cc. *M*/10 phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. salt solution + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25°.

a. Oxygen uptake after 60 minutes.



b. Oxygen uptake after 120 minutes.

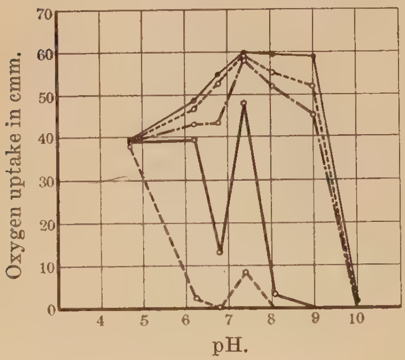


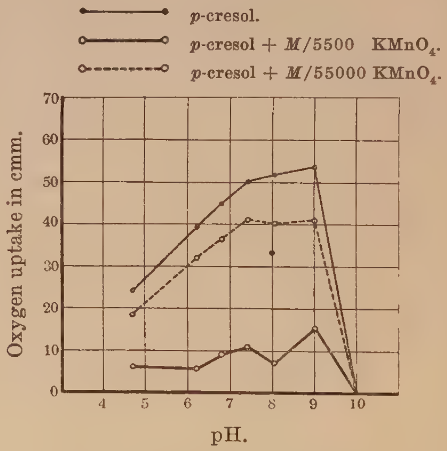
Fig. 11.

Effect of $KMnO_4$ on the tyrosinase activity (alumina preparation) at varying pH.

0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 3.0 cc. *M*/10 phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. salt solution + 0.5 cc tyrosinase solution.

Temp. = 25°.

a. Oxygen uptake after 60 minutes.



b. Oxygen uptake after 120 minutes.

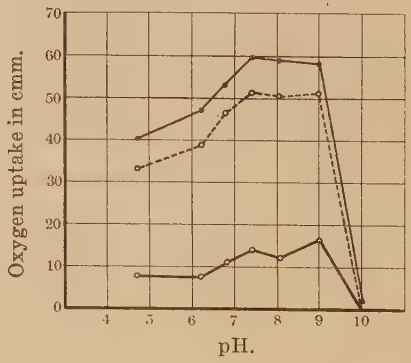


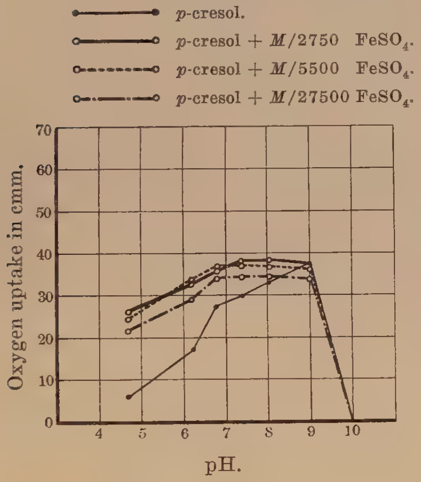
Fig. 12.

Effect of $FeSO_4$ on the tyrosinase activity (alumina preparation) at varying pH.

0.5 cc. $M/300$ p-cresol + 3.0 cc. $M/10$ phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. salt solution + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25°.

a. Oxygen uptake after 30 minutes.



b. Oxygen uptake after 120 minutes.

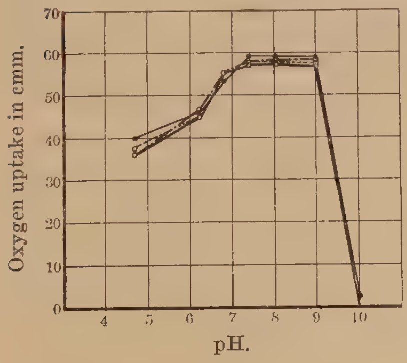


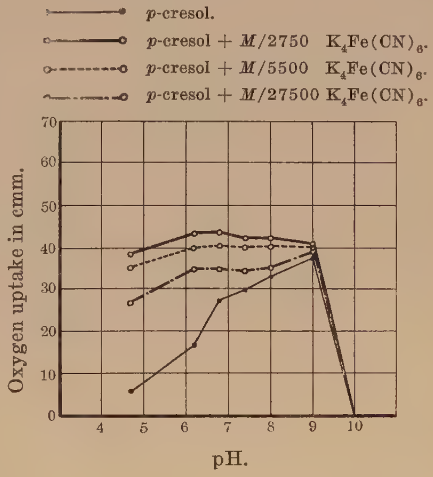
Fig. 13.

Effect of $K_4Fe(CN)_6$ on the tyrosinase activity (alumina preparation) at varying pH.

0.5 cc $M/300$ *p*-cresol + 3.0 cc. $M/10$ phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. salt solution + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25°.

a. Oxygen uptake after 30 minutes.



b. Oxygen uptake after 120 minutes.

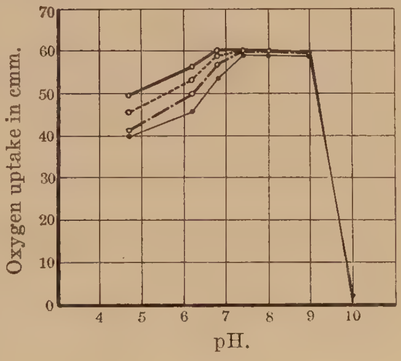


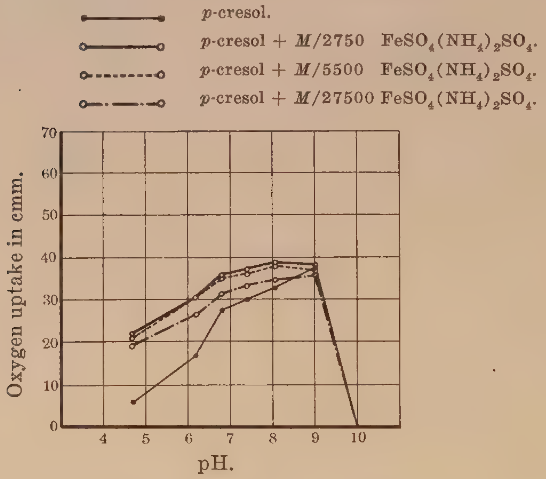
Fig. 14.

Effect of $FeSO_4(NH_4)_2SO_4$ on the tyrosinase activity (alumina preparation) at varying pH.

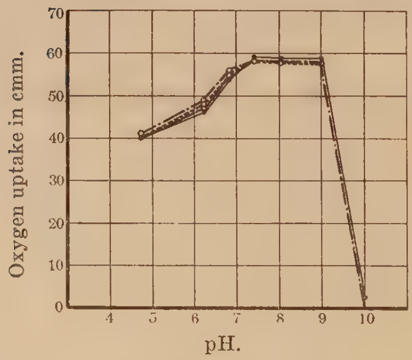
0.5 cc. $M/300$ p-cresol + 3.0 cc. $M/10$ phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. salt solution + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25°.

a. Oxygen uptake after 30 minutes.



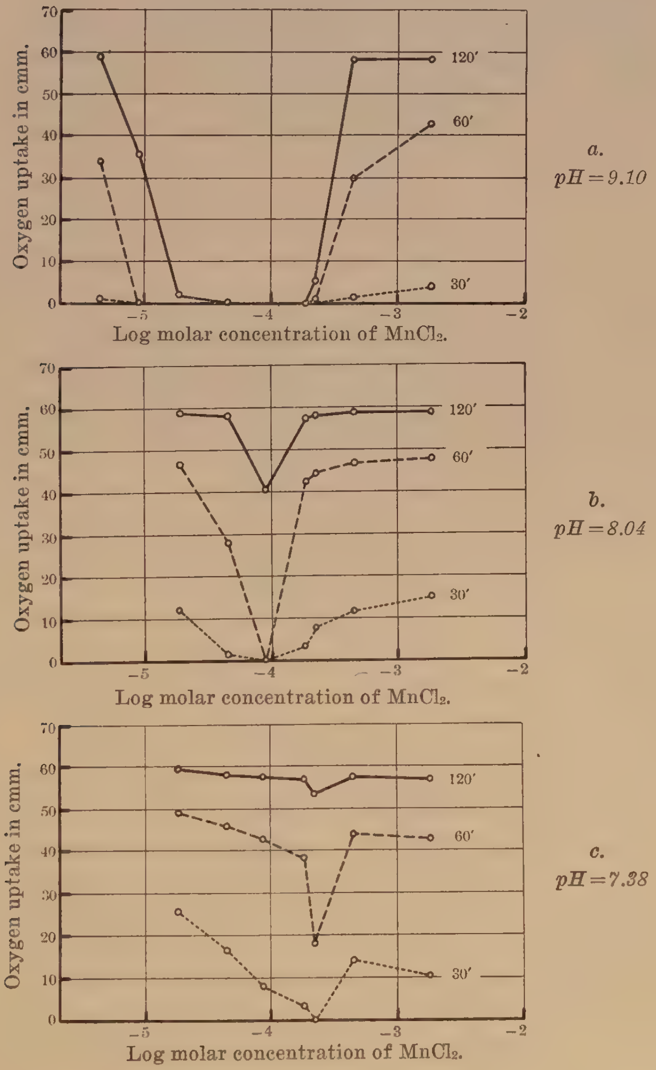
b. Oxygen uptake after 120 minutes.



represents log molar concentration of salt. In Table I are contained the concentrations of $MnCl_2$, at which the salt brings about the maximum inhibition of tyrosinase at varying pH.

Fig. 15.

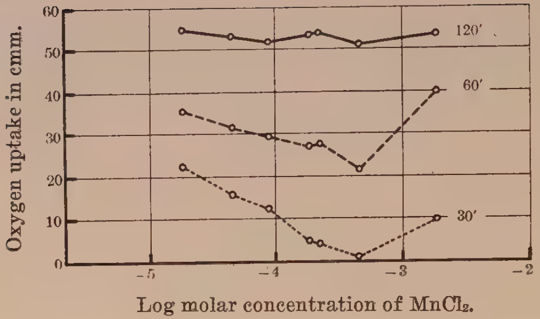
Effect of the addition of $MnCl_2$ at varying concentration and at varying pH. 0.5 cc. $M/300$ *p*-cresol + 3.0 cc. $M/10$ phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. salt solution + 0.5 cc. tyrosinase solution.
Temp. = 25°.



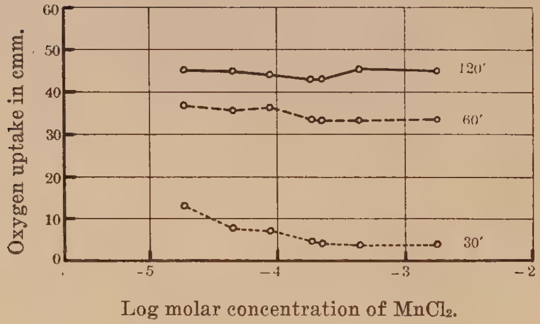
a. *pH = 9.10*

b. *pH = 8.04*

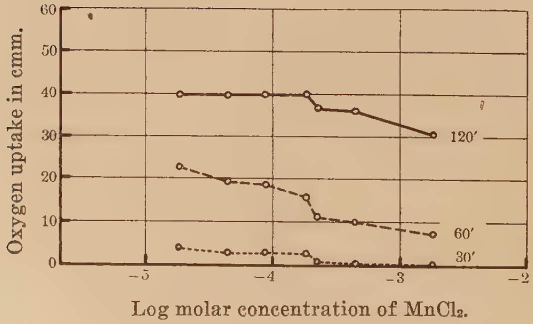
c. *pH = 7.38*



d.
pH = *6.81*



e.
pH = *6.23*



f.
pH = *4.70*

From Table I it follows that at alkaline reactions only a small amount of $MnCl_2$ suffices to bring about the maximum inhibition of the tyrosinase, while at acid reactions a larger amount of the salt is necessary.

TABLE I.

pH.	Concentration of $MnCl_2$ causing maximum inhibition of tyrosinase
9.00	1/5500–1/22000 mol.
8.04	1/11000 mol.
7.38	1/ 4400 mol.
6.81	1/ 2200 mol.
6.23	1/ 2200 mol.
4.70	1/ 550 mol.

As mentioned above the inhibition of tyrosinase activity by KCN takes place only at the alkaline solutions. In this connection the question arises that HCN may be expelled in the gas space from the solution by shaking in the acid mixtures, thus resulting in the abolishment of the inhibitory effect. As the hydrocyanic acid, liberated in the Warburg's vessel, must possibly be absorbed in the KOH solution in the central compartment, a series of tyrosinase systems of different pH were added with *M*/100 KCN solution, shaken for 120 minutes in the usual manner, and after that the KOH solutions were tested for KCN by applying the Prussian blue reaction with ferrous and ferric salts. The results are given in Table II.

TABLE II.

pH.	4.70	6.23	7.38	8.04	9.00
Formation of Prussian blue	+ + +	+ +	+	±	–

From Tabel II it will be seen that by shaking in the acid mixtures HCN can be given off from the solution and taken up in the KOH solution contained in the central compartment.

D. In order to obtain more extensive information on the effect of manganese salt the following series of experiments was undertaken.

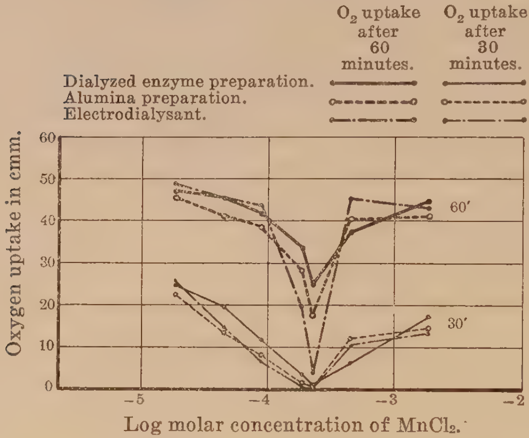
a. We compared at first the effect of the manganese salt on the three enzyme preparations of different purities and the results as shown in Fig. 16 were obtained.

Fig. 16.

Effect of $MnCl_2$ on the three enzyme preparations (dialyzed enzyme preparation, alumina preparation and electrodialysant).

0.5 cc. $M/300$ p-cresol + 3.0 cc. $M/10$ phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. salt solution + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25° pH = 7.38.



It is clear from Fig. 16 that the maximum inhibition of the three enzyme preparations by $MnCl_2$ is always exerted at the concentration of 1/4400 mol, and that the purer enzymes are liable to be more strongly inhibited than the impure ones.

b. With the concentration of manganese salt kept constant, the amount of enzyme (alumina preparations) was then varied and the results as shown in Fig. 17 were obtained.

Just as in the case of the preceeding experiment, so also in this case, the most marked depression of oxygen uptake is brought about at the salt concentration of 1/4400 mol, no matter whether the amount of the enzyme is great or small, and that the smaller

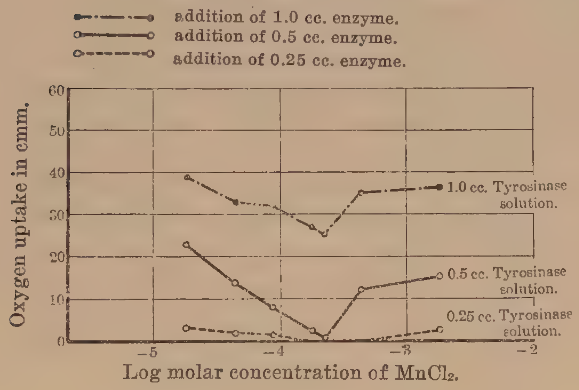
Fig. 17.

Effect of $MnCl_2$ on the varying amount of enzyme (alumina preparation).

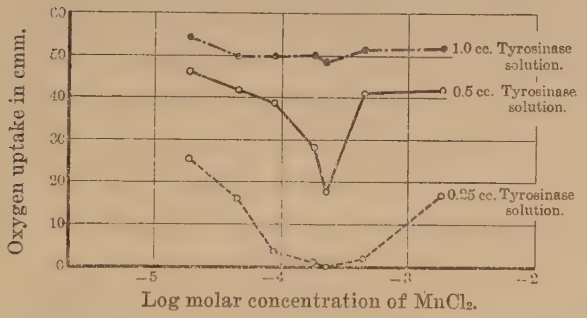
0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 3.0 cc. *M*/10 phosphate buffer + 0.75–0.0 cc. distilled water + 1.0 cc. $MnCl_2$ + 0.25–1.0 cc. tyrosinase solution.

Temp. = 25°. pH = 7.38.

a. Oxygen uptake after 30 minutes.



b. Oxygen uptake after 60 minutes.



the amount of enzyme employed the more distinctly the inhibition of the enzyme took place.

c. In this experiment the order of the addition of *p*-cresol and tyrosinase was altered as follows. In the case of curve II in Fig. 18 the tyrosinase was added to the mixture of *p*-cresol and $MnCl_2$ in the ordinary way. In the case of curve III the tyrosinase was at first mixed with $MnCl_2$ solution and shaken at pH 7.38 as usual. After 60 minutes' shaking, *p*-cresol was added from a side chamber and the resulting oxygen uptake was followed. As can be seen from the figure there is no marked difference in the rates of oxygen uptake in both cases. Curve I shows for comparison the rate of oxygen consumption in the absence of $MnCl_2$.

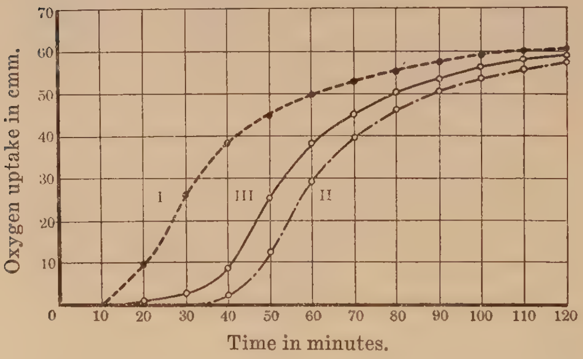
Fig. 18.

Curve I. (0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 3.0 cc. *M*/10 phosphate buffer + 1.5 cc. distilled water) + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Curve II. (0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol + 3.0 cc. *M*/10 phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. *M*/800 $MnCl_2$) + 0.5 cc. tyrosinase solution.

Curve III. (0.5 cc. tyrosinase solution + 3.0 cc. *M*/10 phosphate buffer + 0.5 cc. distilled water + 1.0 cc. *M*/800 $MnCl_2$) + 0.5 cc. *M*/300 *p*-cresol.

Temp. = 25°. pH = 7.38.



Summary.

The potato tyrosinase was purified successively by precipitation with alcohol, by adsorption with aluminium hydroxide suspension C_r and electrodialysis and by use of these enzyme preparations the effect of the addition of various salts on the tyrosinase action was examined.

1. Tyrosinase shows a wide range of optimum pH between pH 7 and 9. No appreciable difference in the optimum pH is observed in the experiments with three enzyme preparations of

different purities. At reactions more alkaline than pH 11 or more acid than pH 4 tyrosinase rapidly loses its activity.

2. The optimum temperature for the tyrosinase action lies at 35–40°.

3. KCN, $AgNO_3$, $HgCl_2$, $MnCl_2$, $K_3Fe(CN)_6$ and $KMnO_4$, inhibit the action of tyrosinase, whereas $FeSO_4$, $K_4Fe(CN)_6$ and $FeSO_4(NH_4)_2SO_4$ bring about its activation. No essential difference is noted between the experiments with alumina preparations and electrodialysant.

4. The inhibiting action of KCN takes place only at the alkaline reaction, due to the liberation of HCN from the acid reaction mixtures by shaking in the Warburg's vessel.

5. The acceleration of tyrosinase by $FeSO_4$, $K_4Fe(CN)_6$ and $FeSO_4(NH_4)_2SO_4$ occurs mainly at the acid reactions.

6. $MnCl_2$ depresses the tyrosinase action only at a definite concentration. At higher or lower concentrations than this the inhibition occurs to a less extent. At acid reactions a larger amount of salt is necessary to bring about the maximum inhibition. At pH 7.38 the addition of 1/4400 mol $MnCl_2$ always causes the maximum inhibition, irrespective of the amount of enzyme added or the purity of the enzyme preparations employed.

In the conclusion I wish to express my thanks to Assist. Prof. T. Uchino for his guidance throughout the course of this investigation.

The expense of this research was defrayed by the Foundation for the Promotion of Scientific and Industrial Research in Japan.

REFERENCES.

Graubard, M. and Nelson, J. M. (1935): Journ. Biol. Chem., **111**, 757.
Nobutani, F. (1936): Journ. Biochem., **23**, 455.
Pugh, C. E. H. (1932): Biochem. Journ., **26**, 106.
Tamai, M. (1935): Journ. Biochem., **23**, 1.

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

ÜBER ARGINASEWIRKUNG BEI KANINCHEN MIT GESTÖRTER LEBERFUNKTION.

Von

MASARU KAIJU.

(*Aus dem Utzino-Laboratorium des Instituts für Chemische Forschung an der Kaiserlichen Universität Kyoto. Vorstand: Prof. S. Utzino.*)

(Eingegangen am 2. Juli 1938)

Für die Lehre vom Stoffwechsel der Leber unter normalen und pathologischen Bedingungen scheint die Frage von grösster Bedeutung zu sein, in welchem Masse die Arginase im lebenden Organismus eine Rolle spielt. Dem experimentellen Nachweis von Krebs und Henseleit (1932) zufolge soll die Hauptaufgabe der Leberarginase darin bestehen, die Synthese des Harnstoffs zu bewirken. Wie schon erwähnt, gilt es seit der Entdeckung Edlbachers (1925) als bekannte Tatsache, dass die Arginase in der Leber viel deutlicher als in anderen Geweben nachgewiesen wird. Vom Standpunkt der pathologischen Chemie halte ich es darum für durchaus notwendig, das Verhalten der Arginasewirkung der Leber und der anderen Gewebe unter Leberschädigung zu studieren.

Schon von vielen Seiten wurden biochemische Studien über Funktionsanomalien d.h. Hypo-, Hyper- und Dysfunktion der Leber ausgeführt. In der vorliegenden Arbeit habe ich die Arginasewirkung der Leber sowie auch der anderen Gewebe von Kaninchen, deren Leber geschädigt wurde, unter Berücksichtigung ihrer Aktivierung durch Mangansulfat untersucht. Als Leberschädigung kam Vergiftung mit Phosphor, Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff sowie Unterbindung des Ductus choledochus in Betracht. Alle Lebergifte wurden unter gewissen Bedingungen angewandt.

In dieser Arbeit möchte ich die ohne Aktivator bestimmte Arginasewirkung in situ als Aktivität der Arginase und die Wirkung, die mit Mangansulfatlösung als Aktivator bei einer Konzentration von 1/3000 Mol bestimmt wurde, als Vollaktivität derselben bezeichnen.

Die Aktivität sowie die Vollaktivität der Leberarginase des Normalkaninchens zeigen einen starken Wert, d. h. auch bei der Verdünnung des Mazerationssafts mit Wasser aufs 100fache Volumen beträgt die Menge des gespaltenen Arginins ca. 45–50% des Gesamtarginins für Aktivität und ca. 70–80% für Vollaktivität. Hat man aber dem Kaninchen einerseits Phosphor, Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff gegeben oder anderseits den Gallengang unterbunden, so zeigten sich die Aktivität und die Vollaktivität der Leberarginase sehr deutlich abgeschwächt. Doch stehen diese Werte der argininspaltenden Fähigkeit der geschädigten Leber in einem hohen Grade nach, im Vergleich zu den anderen Organen dieses Tieres.

Hinsichtlich der Niere und Lunge, die bei dem normalen Kaninchen eine verhältnismässig deutliche Arginasewirkung aufweisen, habe ich weder besondere Verstärkung noch auffallende Abschwächung der Arginasewirkung auch nach der Leberschädigung durch Lebergifte oder durch Gallengangsunterbindung beobachtet.

Die Milz des Normalkaninchens hat auch das zugesetzte Arginin in mässigem Grad nach 24 stündiger Digestion gespalten, in den pathologischen Fällen aber einen stärkeren Spaltungswert gezeigt, besonders deutlich im Falle von Tetrachlorkohlenstoffvergiftung.

Nach der Untersuchung von Edlbacher und Röthler (1925) soll die Arginasewirkung im Blute der folgenden Tiere nicht nachgewiesen werden: Hund, Katze, Kaninchen, Meerschweinchen, Maus, Ratte, Huhn, Taube und Gans. Edlbacher, Krause und Merz (1927) haben das Ferment im Blute von Mensch, Rind, Hammel und Schwein konstatiert, und zwar in der Hauptsache in von Serum getrennten Blutkörperchen, deren Arginasewirkung aber durch die Gegenwart von Serum stark gehemmt wurde. Iwabuchi (1937) gelangte ebenfalls zu gleichen Resultaten, was auch bei der Aktivierung durch Mangansulfat der Fall war.

Im Menschenblut konnte ich auch das Vorhandensein einer deutlichen Arginasewirkung bestätigen; das Kaninchenblut zeigte dagegen nur eine sehr schwache oder ganz minimale Arginasewirkung, die durch Aktivierung mit Mangansulfat deutlich beeinflusst wurde. Die Blutkörperchen der normalen Kaninchen liessen ebenfalls eine äusserst schwache Spaltungsfähigkeit erkennen, wenngleich auch die letztere bei der Aktivierung beobachtet wurde.

Trotz dieser allgemein festgestellten sehr schwachen Arginasewirkung des Kaninchenblutes tritt doch merkwürdigerweise eine sehr deutliche Verstärkung derselben auf, wenn man das Tier mit oben erwähnten Giften behandelt oder an ihm die Gallengänge unterbindet. Das Plasma vermag auch mehr als ca. 50% des zugesetzten Arginins zu spalten, ebensowie das Vollblut. Diese durch Leberschädigung verursachte nennenswerte Verstärkung der Arginasewirkung des Vollblutes oder Plasmas liess sich im Blutkörperchen nicht beobachten. Die Blutkörperchen des lebergeschädigten Kaninchens vermochten Arginin nur wenig oder ein wenig zu spalten. Im Fall von Vollaktivität der Arginasewirkung bei der Aktivierung durch Mangansulfat war das Vollblut, beziehungsweise das Plasma, imstande ca. 80–90% des Gesamtarginins anzugreifen. Die Aktivierbarkeit scheint doch nicht so auffallend gesteigert zu werden, da die Aktivität, verglichen mit der Vollaktivität, sehr stark war.

Was die Frage nach der biologischen Ursache betrifft, die für diese Veränderung der Blutarginasewirkung von lebergeschädigten Kaninchen verantwortlich zu machen ist, müssen wir einstweilen noch die Antwort schuldig bleiben. Man kann wohl hier daran erinnern, dass bei der Leberschädigung, z. B. durch Phosphor, wegen gesteigerter Autolyse der Zelleiweissstoffe ein Freiwerden (Loslösen) und ein Übergang der Endsubstanz z. B. des Endenzyms des Zellinnern in die Blutbahn stattfinden dürfte. Für die Richtigkeit dieser Vermutung sprächen auch die Beobachtungen mit Galle. Betreffs derselben habe ich ebenfalls eine merkwürdige Verstärkung festgestellt, während in der Normalgalle des Kaninchens die Arginasewirkung als minimal, wie im Blut, nachgewiesen wurde. In den Fällen, wo es sich um Kaninchen mit Gallengangsunterbindung handelte, habe ich die Arginasewirkung der in der Blase gesammelten dicken Galle bestimmt.

Zur Kontrolle untersuchte ich die Arginasewirkung des Hungerkaninchens, und zwar nach 6 tägigem Hungern. Die Mazerationssäfte der Lunge, Leber und Milz des Hungerkaninchens vermögen in gleichem Grade, wie die des Normalkaninchens, das zugesetzte Arginin abzuspalten. Nur in den Mazerationssäften der Niere des Hungerkaninchens habe ich deutlich eine in höherem Grade verstärkte Arginasewirkung ohne Aktivator (Aktivität) als beim gesunden Kaninchen beobachtet. Was dagegen die Vollaktivität anbetrifft, die mit dem Aktivator bestimmt wurde, stellte ich einen fast normalen Wert fest (Tabelle VI). Hervorzuheben ist noch, dass in dem Blute des Hungerkaninchens, obgleich bei den lebergeschädigten Kaninchen eine deutlich erhöhte Arginasewirkung des Blutes nachgewiesen worden war, keine Verstärkung der argininspaltenden Fähigkeit bemerkt wurde.

Experimenteller Teil.

Zur Schädigung der Leber des Kaninchens wurden 2 ccm 0,2%iges Phosphorolivenöl oder 1 ccm 20%iges Chloroformolivenöl pro Kilogramm subkutan injiziert und 1 ccm Tetrachlorkohlenstoff pro Kilogramm per os verabreicht. Die Unterbindung der Gallengänge des Kaninchens fand in üblicher Weise statt. Die Versuche wurden zu bestimmten Zeiten, d. h. 48 Stunden nach der Phosphorinjektion, 24 Stunden nach der Chloroforminjektion oder der oralen Gabe von Tetrachlorkohlenstoff und 72 Stunden nach der Gallengangsunterbindung angestellt.

Enzymlösung: Leber, Niere, Lunge und Milz wurden fein geschnitten, dann im Mörser mit dem dreifachen Volumen Glycerin-Wasser (5:5) mit Essigsäure von 0,05%igem Gehalt gut zerrieben, durch ein feines Sieb koliert und schliesslich unter einer Toluolschicht im Eisschrank aufbewahrt. Beim Gebrauch wurde nur der Mazerationssaft der Leber des Tiers aufs 100fache mit Wasser verdünnt, da diese Enzymlösung eine sehr starke Einwirkung auszulösen vermag. Für jeden Versuch wurde je 1 ccm dieser Enzymlösung, mit Ausnahme der Milzenzymlösung (0,5 ccm), verwendet. 9 Teile Blut wurden mit 1 Teil 2%iges Kaliumoxalat in physiologischer Kochsalzlösung gut gemischt. Von diesem Oxalatblut wurde das Plasma abgetrennt; die abgeschleuderten Erythrocyten wurden nach einmaligem Waschen mit physiologischer Salzlösung bis auf das ursprüngliche Blutvolumen mit Wasser verdünnt. Diese letztere Lösung bezeichnete ich einfach als Erythrocytenlösung. Das von den Blutzellen abgetrennte Plasma wurde als Enzymlösung verwendet. Es wurde also 1 ccm Vollblut, Plasma oder Erythrocytenlösung benutzt.

Versuchsansatz: 5 ccm 2%iger Argininchlorhydratlösung wurden mit 8 ccm 0,1 Mol Glycin-NaCl-NaOH-Puffer von P_H 9,2, 1 ccm Enzymlösung und 1 ccm Wasser unter Toluolzusatz bei 37° digeriert. Zur Aktivierung wurde statt 1 ccm Wasser 1 ccm Mangansulfatlösung von 0,005 Mol zugesetzt und die Lösung der Digestion mit Argininpufferlösung, wie oben dargestellt, unter-

TABELLE I.

Arginasewirkung des Normalkaninchens.

Enzymlösung	ohne Mangansulfatlösung		mit Mangansulfatlösung	
	Zunahme der 0,02n-Säure (ccm)	Spaltung (%)	Zunahme der 0,02n-Säure (ccm)	Spaltung (%)
Leber (0,01 ccm)	19,80	43,4	32,90	72,1
	22,00	48,2	36,50	80,0
Niere (1,00 ccm)	14,00	30,7	31,20	68,4
	14,60	32,0	35,60	78,0
Lunge (1,00 ccm)	10,20	22,3	22,00	48,2
	13,80	30,2	28,00	61,4
Milz (0,50 ccm)	3,55	7,8	11,20	24,5
	2,30	5,0	9,20	20,2
Vollblut (1,00 ccm)	0,50	1,1	2,10	4,6
	1,00	2,1	3,50	7,6
Blutplasma (1,00 ccm)	0,60	1,3	3,00	6,5
	1,50	3,2	4,80	10,5
Blutkörperchen (1,00 ccm)	0,40	0,8	0,50	1,1
	0,50	1,1	1,50	3,3
Galle (1,00 ccm)	0,70	1,5	1,70	3,7
	0,90	1,9	2,85	6,2

worfen.

Nach 24 stündiger Digestion wurde der gebildete Harnstoff in 15 ccm Digestionslösung nach der Urease-Methode in Ammoniak überführt, das nach der Folinschen Methode in die berechnete Menge 0,02 *n*-Schwefelsäure abdestilliert wurde. Zur Kontrolle wurden Versuche mit Argininlösung ohne Enzym einerseits und mit Enzymlösung ohne Substrat anderseits angestellt. Die betreffenden Kontrollwerte wurden von den Werten der Hauptversuche abgezogen. In der Tabelle sind die zur Neutralisation verbrauchte Säuremenge (ccm 0,02 *n*-Schwefelsäure) und der Prozentsatz der zersetzten Argininmenge für das Gesamtarginin angegeben.

Tabelle II.

Arginasewirkung des mit Phosphor vergifteten Kaninchens.
(48 Stunden nach der subkutanen Injektion von
2 ccm 0,2%igen Phosphorolivenöls pro kg)

Enzymlösung	ohne Mangansulfatlösung		mit Mangansulfatlösung	
	Zunahme der 0,02*n*-Säure (ccm)	Spaltung (%)	Zunahme der 0,02*n*-Säure (ccm)	Spaltung (%)
Leber (0,01 ccm)	7,00 9,00	15,3 19,7	14,80 17,10	32,4 37,5
Niere (1,00 ccm)	15,50 13,50	33,9 29,6	34,60 31,00	75,9 67,9
Lunge (1,00 ccm)	11,40 9,20	25,0 20,1	28,20 23,50	61,8 51,5
Milz (0,50 ccm)	10,70 7,80	23,5 17,1	28,00 26,00	61,4 57,0
Vollblut (1,00 ccm)	25,90 29,40	56,8 64,4	39,90 38,70	87,5 84,8
Blutplasma (1,00 ccm)	26,70 29,10	58,5 63,8	40,50 36,00	88,8 85,5
Blutkörperchen (1,00 ccm)	0,50 0,70	1,1 1,5	1,40 1,80	3,1 3,9
Galle (1,00 ccm)	10,20	22,4	23,80	52,0

TABELLE III.

Arginasewirkung des mit Chloroform vergifteten Kaninchens. (24 Stunden nach der subkutanen Injektion von 1 ccm 20%igen Chloroformolivenöls pro kg)

Enzymlösung	ohne Mangansulfatlösung		mit Mangansulfatlösung	
	Zunahme der 0,02*n*-Säure (ccm)	Spaltung (%)	Zunahme der 0,02*n*-Säure (ccm)	Spaltung (%)
Leber	10,20	22,4	20,55	45,1
(0,01 ccm)	9,90	21,7	31,80	69,7
Niere	14,60	32,0	34,30	75,2
(1,00 ccm)	12,60	27,6	32,10	70,4
Lunge	10,10	22,1	21,20	46,5
(1,00 ccm)	8,55	18,7	19,50	42,7
Milz	11,80	25,8	21,20	46,5
(0,50 ccm)	4,60	10,1	14,50	31,8
Vollblut	31,70	69,5	36,80	80,7
(1,00 ccm)	29,70	65,1	34,90	86,5
Blutplasma	32,50	71,3	37,00	81,1
(1,00 ccm)	30,20	66,0	34,95	86,6
Blutkörperchen	0,60	1,3	2,70	5,9
(1,00 ccm)	0,10	1,5	3,00	6,5
Galle	9,00	19,7	18,80	41,2
(1,00 ccm)	8,50	18,6	16,70	36,6

TABELLE IV.

Arginasewirkung des mit Tetrachlorkohlenstoff vergifteten Kaninchens. (24 Stunden nach der oralen Gabe von 1 ccm Tetrachlorkohlenstoff pro kg)

Enzymlösung	ohne Mangansulfatlösung		mit Mangansulfatlösung	
	Zunahme der 0,02*n*-Säure (ccm)	Spaltung (%)	Zunahme der 0,02*n*-Säure (ccm)	Spaltung (%)
Leber	9,20	20,1	17,30	37,9
(0,01 ccm)	10,30	22,5	18,10	39,7
Niere	13,60	29,8	29,50	64,7
(1,00 ccm)	13,80	30,2	30,80	67,5
Lunge (1,00 ccm)	13,25	29,0	28,50	62,5
Milz	15,00	32,8	30,80	67,5
(0,50 ccm)	11,40	25,0	28,65	62,8
Vollblut	31,10	68,2	37,30	81,8
(1,00 ccm)	34,20	75,0	39,20	85,9
Blutplasma	32,60	71,5	39,20	85,9
(1,00 ccm)	34,40	75,4	40,10	87,9
Blutkörperchen	0,40	0,9	2,10	4,6
(1,00 ccm)	1,00	2,2	3,60	7,8
Galle	8,50	18,6	27,30	60,0
(1,00 ccm)	11,20	24,5	26,90	58,9

TABELLE V.

Arginasewirkung des Kaninchens mit unterbundenem Gallengang.
(72 Stunden nach Unterbindung des Gallenganges)

Enzymlösung	ohne Mangansulfatlösung		mit Mangansulfatlösung	
	Zunahme der 0,02n-Säure (ccm)	Spaltung (%)	Zunahme der 0,02n-Säure (ccm)	Spaltung (%)
Leber (0,01 ccm)	13,80	30,3	19,50	42,8
	14,70	32,2	25,20	55,2
Niere (1,00 ccm)	12,50	27,4	29,50	64,7
	14,20	31,1	33,30	73,0
Lunge (1,00 ccm)	11,20	24,6	27,30	59,9
	6,60	14,4	20,40	44,7
Milz (0,50 ccm)	9,50	20,8	21,50	47,1
	8,80	12,7	20,10	44,0
Vollblut (1,00 ccm)	20,70	45,4	34,90	76,5
	19,40	42,5	34,60	75,8
Blutplasma (1,00 ccm)	21,90	48,0	36,00	78,9
	19,80	43,4	36,20	79,3
Blutkörperchen (1,00 ccm)	0,90	2,0	2,80	6,1
	1,20	2,6	3,10	6,8
Galle (1,00 ccm)	17,20	15,8	16,60	36,4
	10.10	22,1	16,90	37,0

TABELLE VI.

Arginasewirkung des Hungerkaninchens.
(6 Tage gehungert)

Enzymlösung	ohne Mangansulfatlösung		mit Mangansulfatlösung	
	Zunahme der 0,02n-Säure (ccm)	Spaltung (%)	Zunahme der 0,02n-Säure (ccm)	Spaltung (%)
Leber (0,01 ccm)	17,50	38,3	27,50	60,3
	19,60	42,9	30,60	67,1
Niere (1,00 ccm)	27,50	60,3	33,50	73,5
	35,40	77,9	38,10	83,5
Lunge (1,00 ccm)	10,80	23,7	33,60	73,7
	10,30	22,6	23,40	51,3
Milz (0,50 ccm)	2,60	5,7	12,20	26,7
	3,40	7,4	11,00	24,1
Vollblut (1,00 ccm)	0,40	0,9	0,90	2,0
	0,70	1,5	1,50	3,3
Blutplasma (1,00 ccm)	0,40	0,9	0,70	1,5
	0,60	1,3	3,80	8,3
Blutkörperchen (1,00 ccm)	0,40	0,9	0,50	1,1
	1,00	2,2	3,80	8,3
Galle (1,00 ccm)	0,80	1,7	1,40	3,0
	1,60	3,5	6,10	11,2

TABELLE VII.

Arginasewirkung des Menschenblutes.
(18 jähriger gesunder Mann)

Enzymlösung	ohne Mangansulfatlösung		mit Mangansulfatlösung	
	Zunahme der 0,02n-Säure (ccm)	Spaltung (%)	Zunahme der 0,02n-Säure (ccm)	Spaltung (%)
Vollblut (1,00 ccm)	8,10	17,8	31,20	68,0
Blutplasma (1,00 ccm)	0,20	0,4	0,85	1,9
Blutkörperchen (1,00 ccm)	31,00	68,0	33,30	73,0

ZUSAMMENFASSUNG.

Ich habe die Arginasewirkung von verschiedenen Organen sowie des Blutes von Kaninchen, deren Leberfunktion durch Phosphor-, Chloroform- und Tetrachlorkohlenstoffvergiftung oder Gallengangsunterbindung unter gewissen Bedingungen gestört wurde, studiert. Die Ergebnisse sind zusammengefasst wie folgt:

1. Die Leberarginasewirkung zeigte sich nach der Leberschädigung herabgesetzt, obgleich sie noch zu einem deutlichem Grade im Vergleich mit den anderen Organen bestand.

2. Der Spaltungswert des Mazerationssaftes von Niere oder Lunge blieb auch nach der Leberschädigung fast unverändert.

3. Die Arginasewirkung der Milz scheint nach der Leberschädigung verstärkt zu sein, besonders zeigte sich dies verhältnismässig auffallend bei der Tetrachlorkohlenstoffvergiftung.

4. Bei dem Blut, welches von Normalkaninchen eine minimale argininspaltende Fähigkeit zeigt, habe ich eine deutliche Verstärkung der Arginasewirkung nach der Leberschädigung festgestellt. Sogar im Plasma liess sich diese Erhöhung der Arginasewirkung bestätigen. Die Leberschädigung blieb jedoch ohne Einfluss auf die Arginasewirkung des Blutkörperchens.

5. Die Arginasewirkung der Galle, welche auch in minimalem Grade festgestellt werden konnte, liess nach der Leberschädigung

eine deutlich verstärkte Spaltung wahrnehmen.

6. Die Arginasewirkung des Hungerkaninchens betreffend, vermochte ich nicht solchen bemerkenswerten Einfluss wie bei der Leberschädigung zu erkennen. Hier sei nur erwähnt, dass allein die Aktivität der Nierenarginase des Hungerkaninchens einen deutlich erhöhten Wert gezeigt hat, während der Wert nach der Aktivierung mit Mangansulfat fast der gleiche blieb, wie der des Normalkaninchens.

Herrn Prof. S. Utzino möchte ich hier meinen verbindlichsten Dank für unmittelbare Leitung bei Ausführung dieser Arbeit aussprechen.

LITERATUR.

Edlbacher, S. und Bonem, P. (1925): H.-S., **145**, 69.
Edlbacher, S. und Röthler, H. (1925): H.-S., **148**, 264.
Edlbacher, S., Krause, F. und Merz, K. W. (1927): H.-S., **170**, 68.
Iwabuchi, T. (1937): Diese Zeitschr., **26**, 387.
Krebs, H. A. und Henseleit, K. (1932): H.-S., **210**, 33.

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

ÜBER ASCORBINSÄUREOXYDASE.

I. Verteilung der Ascorbinsäureoxydase in den Pflanzen.

Von

TSUTOMU EBIHARA.

(*Aus dem Biochemischen Laboratorium des Kitasato-Instituts, Tokio.*
Direktor: Dr. Akiji Fujita.)

(Eingegangen am 7. Juni 1938)

Szent-Györgyi (1930) hat zuerst in Kohlblättersaft ein Ferment die „Hexoxydase" gefunden, das die Ascorbinsäureoxydation katalysiert. Aus den Studien der Kinetik glaubte er, dass das Ferment von komplizierter Natur sei, und die Oxydation der Ascorbinsäure durch Vermittelung des Zwischenkatalysators „Substanz X" erfolge. Zilva (1934) fand ein ähnliches Ferment im Apfel. Tauber, Kleiner u. Mishkind (1937) haben aus Cucurbita maxima ein ascorbinsäureoxydierendes Ferment die „Ascorbinsäureoxydase" isoliert, das sie von einem differenteren Charakter als die „Hexoxydase" Szent-Györgyis dachten, da das Ferment direkt das Vitamin ohne jede Vermittelung oxydiert. Der Grund ist aber nach Hopkins u. Morgan (1936) nicht genügend, um die beiden Fermente eindeutig unterscheiden zu können. Der gefundene Unterschied hängt nur vom Verhältnis von Substrat zu Enzym ab. Danach sind viele Untersuchungen über das Ferment erschienen. So haben Hopkins u. Morgan (1936) die Gegenwart eines solchen Ferments in Blumenkohl, Srinivasan (1936) in Moringa pterygosperma, Barron, Barron u. Klemperer (1936) in Lattich, Pfirsisch und Brunnenkresse, Kertesz, Dearborn u. Mack (1936) in Kürbis, Erbse, Bohne, Mohr- u. Weissrübe und Spinat, Johnson u. Zilva (1937) in Kohl, Blumenkohl, Gurke und Kürbis bestätigt. Nach den Untersuchungen der letztgenannten Forscher befindet sich in Apfel und

---

1) Diese Ergebnisse wurden am 3. Oktober 1937 auf dem Biochemischen Kongress zu Nagasaki mitgeteilt.

Kartoffel keine Ascorbinsäureoxydase, sondern eine Phenolase, durch deren Wirkung die Ascorbinsäure indirekt mittels des oxydierten Katechins oder Polyphenols oxydiert werden soll. Das Vorhandensein des Ferments „Ascorbinsäureoxydase“ wurde aber von Stotz, Harrer u. King (1937) bezweifelt, indem sie das „Ferment“ dem Kupfer in Verbindung mit unspezifischem Protein zuschrieben. Ob unspezifische Proteinstoffe als Träger der Ascorbinsäureoxydase eindeutig zu erklären sind, ist aber die Frage, die zur Zeit noch zu entscheiden ist, und es soll meine zukünftige Aufgabe sein, auf diese Frage einzugehen. In Zusammenhang damit scheint es mir sehr interessant, dass das Ferment Polyphenoloxydase der Kartoffeln von Kubowitz (1937) als ein Kupfer-Proteid erwiesen wurde.

Meine erste Aufgabe besteht darin, die quantitative Verteilung der Ascorbinsäureoxydase in der pflanzlichen Welt klar zu machen und das günstigste Material zur Herstellung derselben zu finden.

QUANTITATIVE BESTIMMUNGSMETHODE DER ASCORBINSÄUREOXYDASE IN DEN GEWEBEN.

Vorschrift: 2 g des zu untersuchenden Gewebes werden in Porzellanmörser zerrieben, 15 ccm destilliertes Wasser wird zugesetzt und gut gemischt, dann zentrifugiert und filtriert. Das Filtrat wird mit Wasser auf verschiedene Konzentrationen verdünnt. 1.0 ccm Filtrat $(1:v)$, 1.0 ccm Acetatpuffer (bestehend aus 8.9 ccm $n/10$ Natriumacetat, 1.1 ccm $n/10$ Essigsäure und 2.5 ccm $1.0\,n$ NaOH) und 2.0 ccm 20 bis 70 mg-%ige Ascorbinsäurelösung in 2%iger Metaphosphorsäure werden in jedem Reagenzglas gemischt, ins Wasserbad von 38° eingelegt, nach 30 Minuten langem Durchleiten des Sauerstoffes wird 1.0 ccm abpipettiert, 2.0 ccm 4%-ige Metaphosphorsäure und 1.0 ccm Wasser zugesetzt und gut gemischt. Dazu gibt man 2.0 ccm Phosphatpuffer (PH 6.3) und 1.0 ccm 1 m Jodessigsäure, nach 5 Minuten langem Einlegen ins Wasserbad von 40° wird 1.0 ccm Folin-Reagens zugesetzt. Nach 10 Minuten langem Einlegen ins Wasserbad von 40° wird abgekühlt und der Vitamingehalt mit Pulfrich-Photometer kolorimetriert. Über die Methodik siehe Fujita u. Ebihara

(1937). Die gemessen Extinktion sei E. Als Blindversuch (E_0) nimmt man destilliertes Wasser statt Filtrat des Gewebeextrakts und behandelt es genau ebenso. Die Differenz der beiden Werte stellt die Menge der oxydierten Ascorbinsäure dar.

Man berechnet daraus nach der folgenden Formel den „Oxydasequotienten“ (Q).

$$Q = \frac{\text{mg oxydierte Ascorbinsäure}}{\text{mg Frischgewicht des Gewebes} \cdot \text{Stunden.}}$$

$$= \frac{8.13\,(E_0 - E)}{100} \Big/ 10^3 \cdot \frac{1}{v} \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{1}{2}$$

$$= 2.61\,(E_0 - E)\, v \cdot 10^{-3} \left[\frac{1}{\text{Stunden}}\right]$$

Da sich in den Geweben manchmal kochstabile Bestandteile befinden, die ebenfalls die Oxydation der Ascorbinsäure katalysieren, z. B. freies Kupfer, so habe ich als Kontrollversuch immer das Filtrat benutzt, dessen fermentartiger Bestandteil durch 15 Minuten langes Einlegen in kochendes Wasserbad inaktiviert war. Zur Berechnung der Quotienten nimmt man immer die Fälle, bei denen weniger als 20% der zugesetzten Ascorbinsäure oxydiert werden.

Prüfung: Zur Prüfung der Proportionalität zwischen oxydierter Ascorbinsäuremenge und der Konzentration des Ferments wurde die Fermentlösung (Wasserextrakt des Kürbis) mit Wasser auf verschiedene Konzentrationen verdünnt und die oxydierte Ascorbinsäuremenge vorschriftsmässig bestimmt. Die daraus berechneten Q-Werte befinden sich in Tabelle I. Wie daraus

TABELLE I.

$E_0 = 0.820$.

Verdünnung	E	% Ascorbinsäure, oxydiert	$Q \cdot 10^3$
40	0.290	65	55.4
60	0.410	50	64.0
80	0.570	30	51.2
100	0.660	20	42.8
200	0.740	10	42.8

ersichtlich, sind die Werte einigermassen konstant und die Werte, wo unterhalb der 20% der Ascorbinsäure oxydiert sind, stimmen vollkommen überein. Obwohl die Übereinstimmung nicht immer ganz vollkommen ist, so sind doch die berechneten *Q*-Werte praktisch einigermassen konstant. Der quantitative Gehalt der Ascorbinsäureoxydase in den Geweben kann daher mti den *Q*-Werten praktisch genau ausgedrückt werden.

ERGEBNISSE DER MESSUNGEN.

Ich untersuchte insgesamt 40 Obstarten und 60 Arten Gemüse. Da aber die meisten Gewebe sehr wenig Oxydase enthalten, gebe

TABELLE II.
Verteilung der Ascorbinsäureoxydase in den Früchten.
(Die eingeklammerten Zahlen bedeuten die von dem kochstabilen Teil korigierten Werte).

Art	Japanischer Name	Gewebe	*Q*
Cucurbita moscata var. melonaeformis	Kabocha	äussere Haut grün äussere Haut gelbbraun Fleisch	160 [160] 292 [292] 0.5 [0.5]
Cucumis sativus	Kiuri	Haut Fleisch	73 [73] 2 [2]
Cucumis Melo var. conomon	Shirouri	Haut Fleisch	23.2 1.3
Bennincasa hispida	Togan	Haut Fleisch	18.1 1.6
Citrullus vulgaris	Suika	Haut Fleisch	10.4 [4] 0
Cucumis Melo	Melon	Haut Fleisch	7.8 3.1
Malus pumila var. dasphilla	Ringo	Haut Fleisch	28.6 [4] 1.6 [0]
Prunus Mume	Ume	Haut	21 [2]
Eriobotrya japonica	Biwa	Haut Fleisch	20.9 10.4
Prunus Persica	Momo	Haut	15.6 [10]
Pirus serotina	Nashi	Haut	21 [2]
Musa sapientum	Banana	Haut Fleisch	8.1 [3] 2.9 [0]

TABELLE III.

Verteilung der Ascorbinsäureoxydase in den Gemüsen.

Art	Japanischer Name	Gewebe	*Q*
Vicia Faba	Soramame	Hülse	39.4
		Bohnenhaut	11.6
		Bohneninhalt	4.4
Pisum arvense	Endo	Hülse	2.6 [1.4]
		Bohne	10.4 [10.4]
Glycine Soja	Daizu	Hülse	3.5 [2.6]
		Bohne	12 [10]
Ipomoea edulis	Satsumaimo	Haut	21 [8]
		Fleisch	0
Solanum tuberosum	Jagaimo	Haut	12.8 [6.8]
		Fleisch	6
Brassica oleracea var. botrytis	Hanayasai	Blume	2.3
		Blatt	1.3
Brassica oleracea	Saradana	Blatt	18
Cryptotaenia canadensis var. japonica	Mitsuba	Blatt	7.5 [2]
Chrysanthemum morifolium var. sinense	Kiku	Blumenblatt	18.1 [8]
		Blatt	39.4 [18]
„Bancha“ frisch hergestellt.			524 [174]

ich hier nur einige Beispiele an, bei denen relativ viel Oxydase gefunden wurde.

Wie man ersieht, kommen nur Cucurbita und Cucumis wegen des Reichtums und der Reinheit der Oxydase als Ausgangsmaterial in Betracht. „Bancha“-Extrakt oxydiert zwar Ascorbinsäure sehr stark, aber ein nicht unwesentlicher Teil ist kochstabil. Ich benutzte daher für die weiteren Untersuchungen als Ausgangsmaterial des Ferments ausschliesslich Cucurbita und zwar nur dessen äusseren Hautteil. Bei den tierischen Geweben, die ich untersucht habe, nämlich Herz, Leber, Lunge, Milz und Niere der Ratten war keine solche Oxydase nachweisbar.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die quantitative Bestimmungsmethode der Ascorbinsäureoxydase der pflanzlichen Gewebe wurde ausgearbeitet und die

Messungsergebnisse tabellarisch angegeben. Von zahlreichen Geweben ist Cucurbita und zwar dessen äusserer Hautteil am reichsten an Oxydase, dann folgt Cucumis. Die tierischen Gewebe haben keine solche Oxydase.

Diese Arbeit wurde auf Veranlassung von Herrn Dr. A. Fujita ausgeführt, welchem ich an dieser Stelle bestens danke.

LITERATUR.

Barron, Barron, Klemperer (1936): J. Biol. Chem., **116**, 563.
Fujita u. Ebihara (1937): Bioch. Z., **290**, 182, 1937. Achtung! Druckfehlerberichtigung: Bioch. Z., **291**, 433.
Hopkins u. Morgan (1936): Bioch. J., **30**, 1446.
Johnson u. Zilva (1937): Bioch. J., **31**, 438.
Kertesz, Dearborn u. Mack (1936): J. Biol. Chem., **116**, 711.
Kubowitz (1937): Bioch. Z., **292**, 221.
Srinivasan (1936): Bioch. J., **30**, 2077.
Stotz, Harrer u. King (1937): J. Biol. Chem., **119**, 511.
Szent-Györgyi (1930/31): Science, **62**, 125; J. Biol. Chem., **90**, 385.
Tauber, Kleiner u. Mishkind (1935): J. Biol. Chem., **110**, 211.
Zilva (1934): Bioch., J., **20**, 663.

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

FURTHER OBSERVATIONS OF THE EFFECT OF PARENTERAL INJECTION OF AMINO ACIDS AND RELATED SUBSTANCES UPON CREATINE FORMATION AND STORAGE IN THE RAT. A NEW THEORY OF THE ORIGIN OF CREATINE IN THE ANIMAL BODY.*

BY

HOWARD H. BEARD AND PHILLIP PIZZOLATO.

(From the Department of Biochemistry, Louisiana State University Medical Center, New Orleans.)

(Received for publication July 7, 1938)

From a structural point of view, creatine may be considered as a derivative of glycine (amino acetic acid), sarcosine (methyl amino acetic acid), guanidine, methyl guanidine, glycocyamine (guanidine acetic acid), hydantoin (glycolyl urea) or hydantoic acid (uramino acetic acid). It is also the ureide of sarcosine. With the exception of guanidine and hydantoic acid, which were not studied, all of these substances increased the muscle creatine above normal in the experiments to be reported in this paper. Therefore, before any final conclusion can be accepted as to the origin of creatine in the body, all of its supposed precursors should be fed or injected under proper experimental conditions and the effect upon creatine formation in the muscles observed. Some investigators in this field believe that the one and only precursor should bear some structural relation to creatine (arginine, glycocyamine) or creatinine (histidine). Work reported from this and other laboratories shows that this view is incorrect. We have observed increases over 100 per cent in creatine formation when various amino acids and other substances not chemically related to it are fed or injected. To take an analogous case, although the structure of the sugar-forming amino acids is not chemically related to that of glucose, it is well known that the body can transform them into glucose. Thus the criticism of Bodansky (1936), that our positive results with glycine are inconclusive because we obtained increases in creatine formation with other substances not related to it, is untenable.

---

* Presented before the 21st annual meeting of the American Society of Biochemists, Memphis, Tenn., April 12, 1937 and before the Louisiana Section of the American Chemical Society, New Orleans, December 10, 1937.

Published evidence in the experimental and clinical literature during the past ten years shows without a doubt that many different substances may either form creatine or stimulate its formation. We have commented on this subject in several publications (1931–1935). Further information on the origin of creatine since the appearance of Hunter's monograph (1928) will be found in the reviews of the literature by Mitchell and Hamilton (1929), Myers (1932), Rose (1933, 1935), and Kayser (1934).

The purpose of the present investigation was, first, to complete a comparative study of the effect of the injection of all the amino acids of the protein molecule and related substances upon creatine formation; second, to explain why most of them when injected can increase creatine formation above normal; third, to study the mechanism of the reaction; and fourth, to find a more effective precursor of creatine than amino acetic acid for possible use in the treatment of the myopathies.

EXPERIMENTAL.

Young adult rats weighing between 100 and 250 grams were used in all studies. They were fed for a period of 2 weeks to 6 months on our stock diet (2/3 whole wheat flour, 1/3 skim-milk powder with 1 per cent of the weight of the wheat, each, as NaCl and $CaCO_3$) in order to stabilize the creatine content of the muscles. Groups of 25 to 30 rats were studied at a time, with sub-groups of 2 to 5 on the parenteral injection of different amounts (2 to 200 mg.) of various substances, and 5 on the stock diet alone as controls. The animals of a given group were of approximately the same size and age. All substances were dissolved in 0.9 per cent NaCl, with the addition of a few drops of dilute HCl, if necessary, to effect solution. Ornithine and lysine-dihydrochlorides, lactic and pyruvic acids were neutralized before injection. The injection of equivalent amounts of HCl did not increase creatine formation. At the end of 1 to 5 days after injection the animals were sacrificed and creatine (total creatinine) was determined by the method of Rose, Helmer and Chanutin (1927).*

---

* There are several criteria to be considered if increases in creatine formation are to be observed in studies of this nature. (a) Stock Diet. During the past 10 years we have used 364 rats on our stock diet. The average muscle creatine of this large group was 0.39 per cent. The average muscle creatine in 132 control rats in the present experiments was 0.42 per cent, the value we are using for our control level of muscle creatine. Bodansky (1936) used Purina Dog Chow as his control diet and his average value for muscle creatine was *22.5 per cent higher* than those on our stock diet. In 5 animals fed on the Dog Chow we observed a 38 per cent increase over that obtained on our control diet. The Dog Chow is, therefore, not a suitable diet to use if the maximum increases of muscle creatine are to be observed. (b) As pointed out by Benedict and Behre (1936), the full color development between creatinine and picric acid is not obtained until 12 minutes after adding the alkali. This observation was made by us in 1930 and since this time we have always matched our solutions with the standard as close to 12 minutes after adding the alkali as possible. Comparable results are also obtained 8 minutes after adding the alkali. (c) The length of time allowed an injected substance to form creatine should be 24 hours for glycine and 48 hours for most other substances. Bodansky's animals were killed and the muscle analyzed for creatine from 4 to 12 hours after administration of glycine. (d) *The muscle creatine must be studied.* Creatine-creatinine excretion studies, if negative, do not prove that extra creatine was not formed, since it may have been stored in the tissues or transformed into other substances and not excreted into the urine. On the other hand, if there is an increased creatine-creatinine excretion it is evident that the precursor was effective in this connection. (e) None of the 47 different substances, alone or in combination, injected in this study when run through the method used for the determination of creatine, gave an increase in the Jaffe reaction, with the exception of 100 mg. of glycocyamine and hydantoin. Assuming that a 200 mg. rat would possess 80 gm. muscle tissue and that the 100 mg. of glycocyamine or hydantoin should be evenly distributed in the muscle tissue 48 hours after injection, which is very unlikely, then the 1 gm. sample of muscle analyzed would contain 1.2 mg. of either glycocyamine or hydantoin. This amount of hyantoin when run through the method, however, did not give the Jaffe reaction with alkaline picrate. 1.2 mg. of glycocyamine gave only a trace of color under these conditions and, according to Bodansky (1936),

The large increases in muscle creatine to be reported in this paper, after injecting so many different substances, naturally raises the old question of the specificity of the Jaffe reaction for creatinine. The following experiments give conclusive and convincing evidence on this important point:

Exp. 1. Injection of the following substances into young rats gave the following results: 0.1 mg. adrenalin, muscle creatine, 0.33 per cent; 0.044 mg. ephedrin, 0.38 per cent; 4 mg. caffein, 0.81 per cent; control, 0.37 per cent.

Exp. 2. All these experiments were repeated using, in each case, 50 mg. of the specific creatinine enzyme of Miller and Dubos (1937) and 10 cc. muscle filtrate with 10 cc. of phosphate buffer, pH 7, incubated at 37°C. for 5 hours in a 100 cc. Erlenmyer flask. Upon addition of alkaline picrate no Jaffe reaction occurred. This reaction was therefore *specific for creatinine* in these muscle filtrates.

Exp. 3. The samples of Exp. 2 were allowed to stand for 1 day with the alkaline picrate. Some red color was produced, due possibly to the presence of glucose, which shows that the enzyme will *not* prevent the formation of the color due to the presence of glucose in the muscle filtrates.

Exp. 4. Ten mg. glygocyamine plus 20 cc. 2N.H_2SO_4 were autoclaved for 45 minutes at 15 lbs. pressure in a 100 cc. flask. On cooling, 20 cc. of 2N NaOH were added. Ten cc. of the mixture gave a positive Jeffe reaction with alkaline picrate showing the presence of glycocyamidine in the solution. Another 10 cc. of the mixture was incubated at 37°C. for 5 hours with 10 cc. of phosphate buffer (pH_7) and 100 mg. of the creatinine enzyme. Upon adding alkaline picrate the Jaffe reaction was *positive,* showing that the enzyme will not destroy the color of the reaction due to glycocy-

---

injected glycocyamine accumulates in muscle tissue in insufficient amounts for analysis. When cystein-HCl was studied a green color appeared immediately after adding the alkaline picrate, and a red color was observed at the end of 24 hours' standing. Since the color match was made within 12 minutes after adding the alkaline picrate, the above criticism does not apply to the results obtained with cystein-HCl.

amidine.

Exp. 5. Five cc. of urine from rat No. 1, after the injection of 4 mg. of caffein, contained 2.72 mg. total creatinine for the 2-day period following injection. A similar amount of this rat's control urine contained 1 mg. total creatinine. On incubation of 5 cc. of each of these urines with creatinine enzyme, again *no* color was produced upon the addition of alkaline picrate. This shows that all the color produced by the 1.7 mg. (experimental) and 1 mg. (control) total creatinine in the urine samples was *due to creatinine alone.*

The fact that so many different substances give increases in muscle creatine also raises the question of the validity of the analytical work reported in this paper. All of the color comparisons were made by one of us (H.H.B.). In cases where large increases in creatine were obtained the samples were run 3 or 4 times. During the course of this work the Fisher Electrophotometer was purchased and the following comparative values for creatine in muscle filtrates determined by this instrument and the colorimeter are given in Table I.

TABLE I.

Rat No.	Diet	No. of days on experiment	Muscle creatine	
			by colorimeter	by electrophotometer
			per cent	per cent
1	Control	2	0.40	0.42
2	”	2	0.40	0.41
3	”	2	0.41	0.38
4	”	2	0.38	0.38
5	”	2	0.42	0.42
6	”	2	0.41	0.41
			Average 0.40	0.41

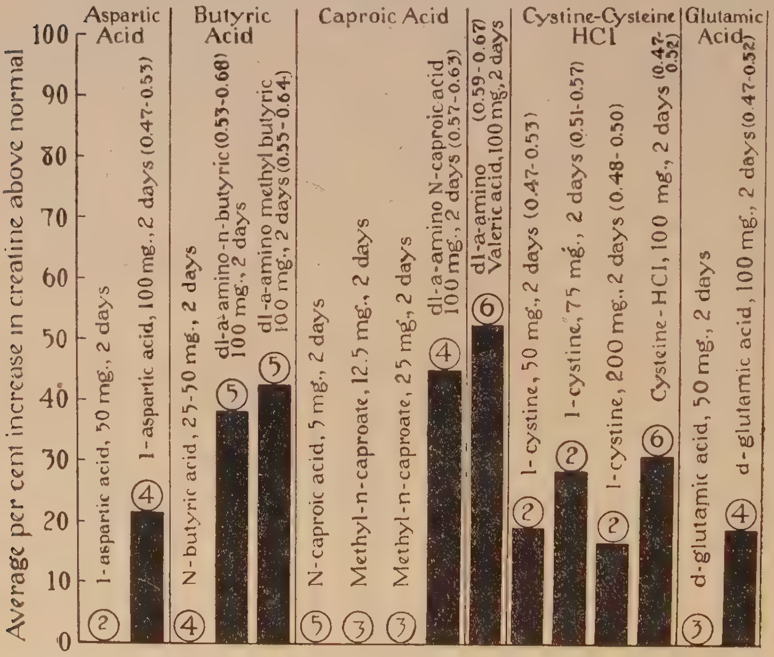
These comparisons prove the validity of the values reported by the colorimeter listed in this paper.

RESULTS AND DISCUSSION.

The average muscle creatine in the 136 control animals was 0.42±0.002 per cent. The average per cent increases with minimum and maximum variations in muscle creatine above this value in the experimental groups are given in Figs. 1 to 9.

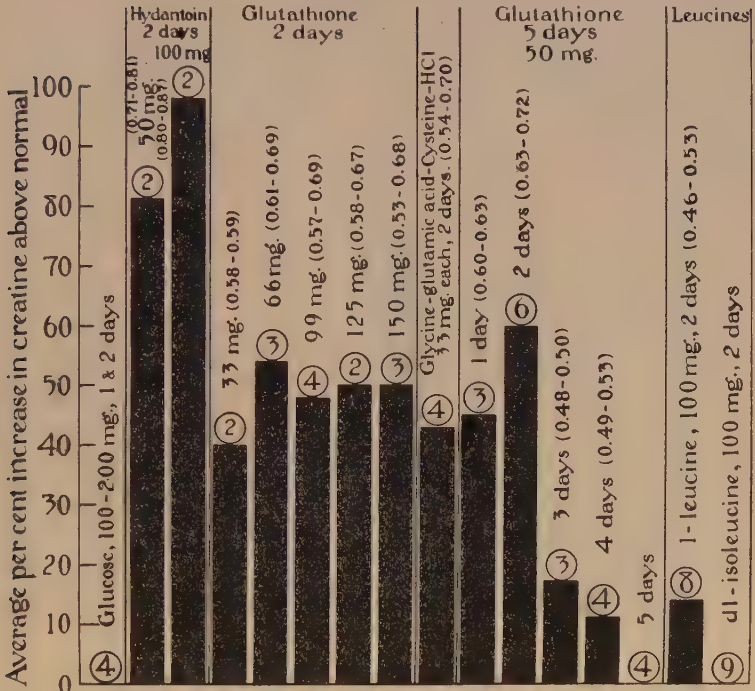
Fig. 1.

Creatine formation from amino acids and related substances. The number in the circles on all charts represent the number of animals used in each experiment. The figures in parenthesis on all charts represent the minimum and maximum per cent of muscle creatine observed in that experiment.



The first point of interest is that the injection of the fatty acids or their methyl derivatives did not increase muscle creatine while their amino derivatives did. (Fig. 1) This shows that the amino group is necessary to carry the fatty acid through the usual paths of amino acid metabolism in the formation of creatine. Thomas, Milhorat and Techner (1933) reported that *x*-amino-

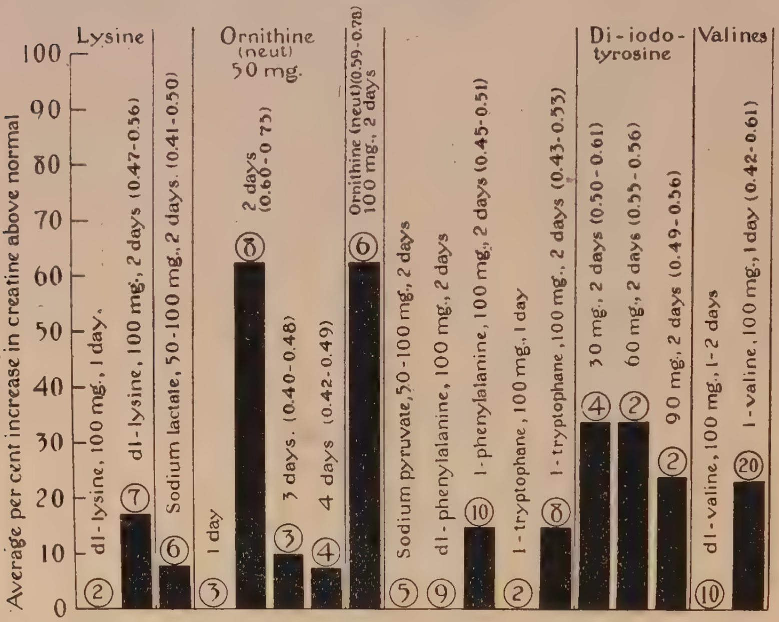
Fig. 2.
Creatine formation and storage from amino acids and related substances.



butyric acid was effective in creatine formation. The metabolism of the fatty acids themselves does not result in the formation of muscle creatine.

The second point of interest is that hydantoin gave very large increases in muscle creatine (Fig. 2). Glutathione, as was to be expected, gave significant increases in muscle creatine. Injection of 33 mg. each of glycine, glutamic acid and cysteine-HCl gave about the same increase as the injection of 99 mg. of glutathione, indicating a possible summation effect on creatine formation (Fig. 2). Ornithine gave very significant increases in muscle creatine, while diiodotyrosine and *l*-valine gave somewhat smaller increases (Fig. 3). Lysine contains only one more CH_2 group than

Fig. 3.
Creatine formation and storage from amino acids and related substances.



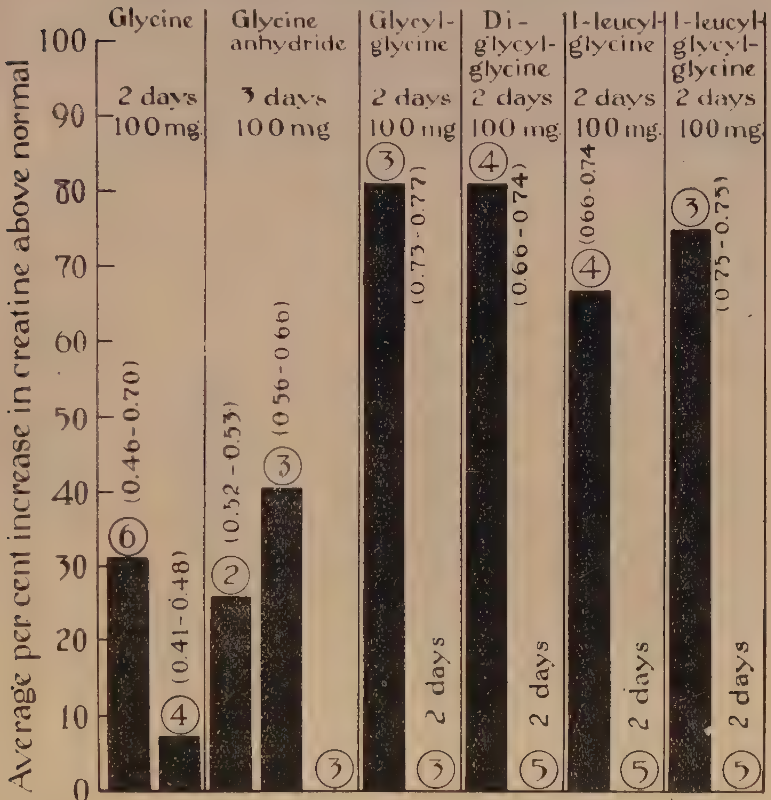
ornithine, yet this substance gave about three or four times as much creatine as lysine. This is evidently due to the fact that ornithine is derived from arginine in metabolism.

The third point of interest is that some of the intermediate products of amino acid metabolism, glucose, lactic and pyruvic acids, did not increase creatine formation (Figures 2 and 3).

The fourth point of interest is that glycine and its derivatives are excellent creatine precursors (Fig. 4). At the end of the second day all of this extra creatine had disappeared, showing that the storage capacity of the muscles for creatine is of short duration. The large amount of experimental and clinical evidence for *glycine as a precursor of creatine is conclusive.* Bodansky's (1936) negative results in this connection are of little, if any, significance. Glycolic acid (Fig. 7) gave significant increases in

Fig. 4.

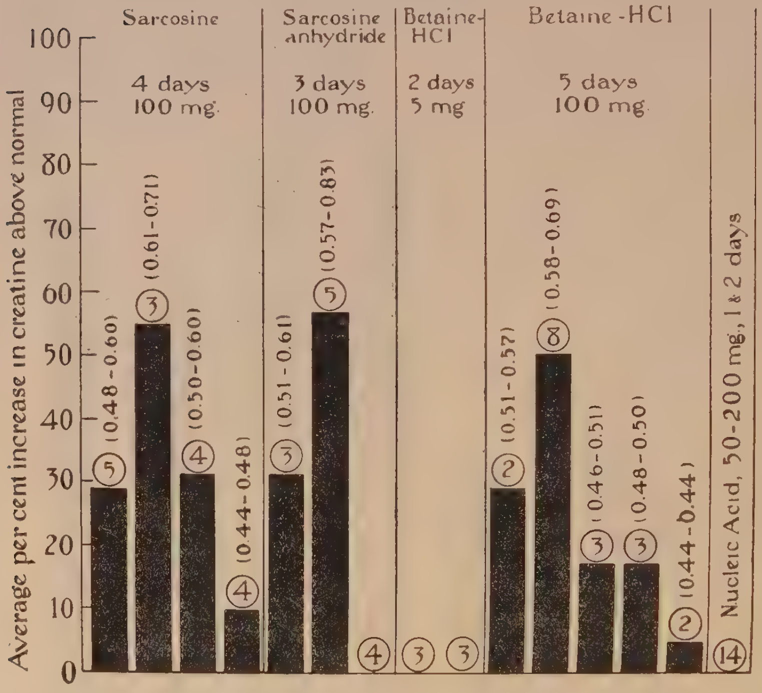
Creatine formation from glycine and its derivatives.



creatine formation, and Milhorat and Toscani (1936) found that this acid gave about one-third the creatine excretion that was obtained from the same amount of glycine.

The fifth point of interest is that possibly all of the amino acids which form creatine may yield glycine in metabolism. Since this manuscript was written, Edlbacher (1937) also suggested the possibility of the formation of glycine from the hydroxy amino acids in metabolism. Further evidence for this view is the fact that proline and hydroxy proline, which do not contain the amino or "glycine group" ($CHNH_2COOH$), do not form extra creatine.

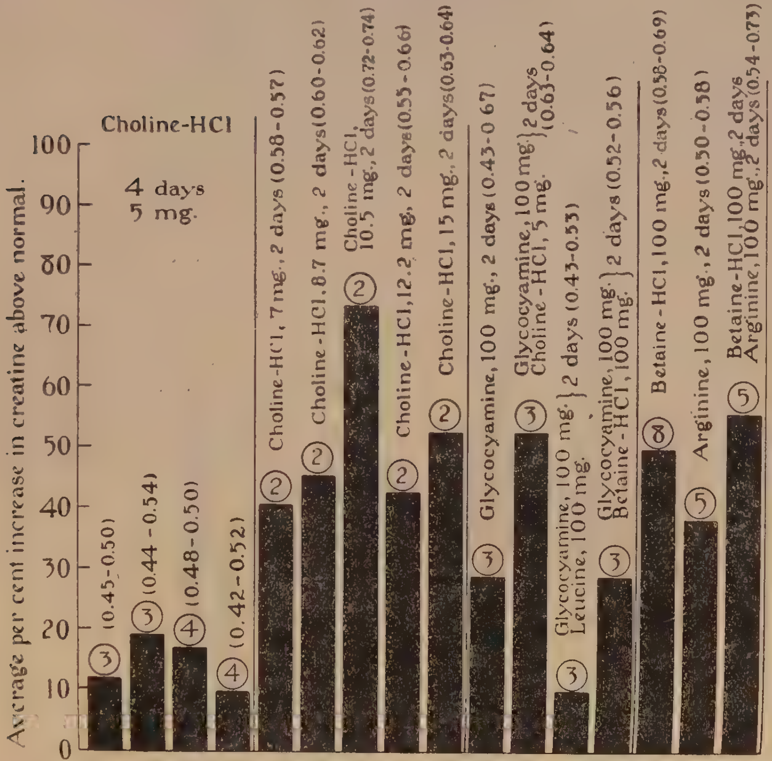
Fig. 5.
Creatine formation and storage from sacrosine, betaine and their derivatives and from yeast nucleic acid.



This indicates that the synthesis of glycine may occur at the expense of some of the other amino acids. We believe, therefore, that this amino acid occupies a central position in amino acid metabolism and in creatine formation in the body.

In suggesting their theory of creatine formation from arginine, Tripoli and Beard (1934) suggested that the function of glycine was also to furnish the methyl group necessary for creatine formation. Further suggestive evidence for this view has recently been reported by Challenger (1936) who stated that the biological methylation in micro organisms, plants and animals may take place through the action of glycine. It was suggested that this amino acid through its deamination products, glyoxylic acid and formaldehyde, is capable of methylating other amino acids, including

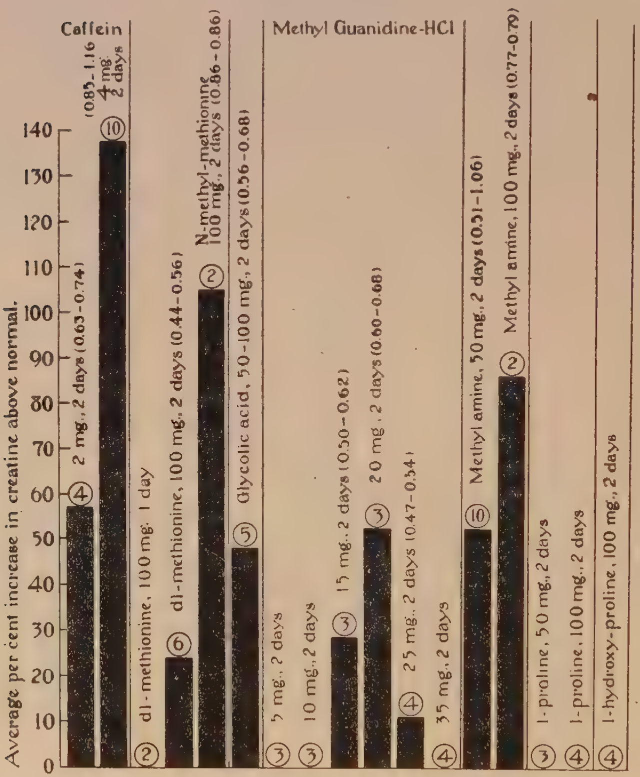
Fig. 6.
Creatine formation and storage from choline, glycocyamine, betaine and arginine, etc.



itself, yielding sarcosine and betaine. Other points of interest in regard to glycine will be discussed below.

The sixth point of interest is shown in the effect of the methyl group upon creatine formation. (See results for caffein, methyl methionine, sarcosine, betaine and choline (Figs. 5, 6, 7). For instance, methyl methionine gave over 80 per cent more creatine than equivalent doses of methionine. Choline (18 per cent) injected with glycocyamine (30 per cent) gave an increase of about 50 per cent. Del Guerra (1934) stated that an increase in creatine compounds is related to the presence of methyl groups,

Fig. 7.
Creatine formation and storage from caffein, methionine, methyl methionine, methyl guanidine, methyl amine and the prolines.



which form creatine under special conditions.

The seventh point of interest is shown in the results obtained with caffein (Fig. 7). The injection of only 4 mg. of this substance gave increases in muscle creatine from 100 to 138 per cent. In a repeat experiment with 8 animals the average increase in muscle creatine was 97 per cent. Since this manuscript was first written 2 additional groups of 12 animals each were again injected with 4 mg. of caffein. Increases from 83 to 140 per cent in muscle creatine and enormous increases up to 6000 per cent in creatine excretion were observed from 2 to 6 days after injection. The excretion of performed creatinine was not affected, showing that in these studies creatinine did not originate from creatine. The results of these studies are now in press. Masayama and Riesser (1931) injected caffein into rabbits and reported a marked increase in the free creatine of the skeletal muscles. Shteinberg (1936) reported similar results when caffein and other pharmacological products were injected into pigeons, and Müller (1936) noticed increased muscular contractions in caffein poisoning.

Methylamine was shown by Kohn (1931) to be a metabolic product of glycine. According to Loffler (1935), dimethylamine forms, next to ammonia, the main constituent of the volatile nitrogenous constituents of normal urine. Kappeler-Adler and Toda (1932) observed a large increase in the excretion of methylamine in the urine in conditions associated with creatinuria. They believe that methylamine is formed from creatine in metabolism. This substance gave large increases in muscle creatine (Fig. 7).

Higher doses of choline or methyl guanidine were somewhat toxic and reduced creatine formation. No other cases of toxicity occurred in these studies.

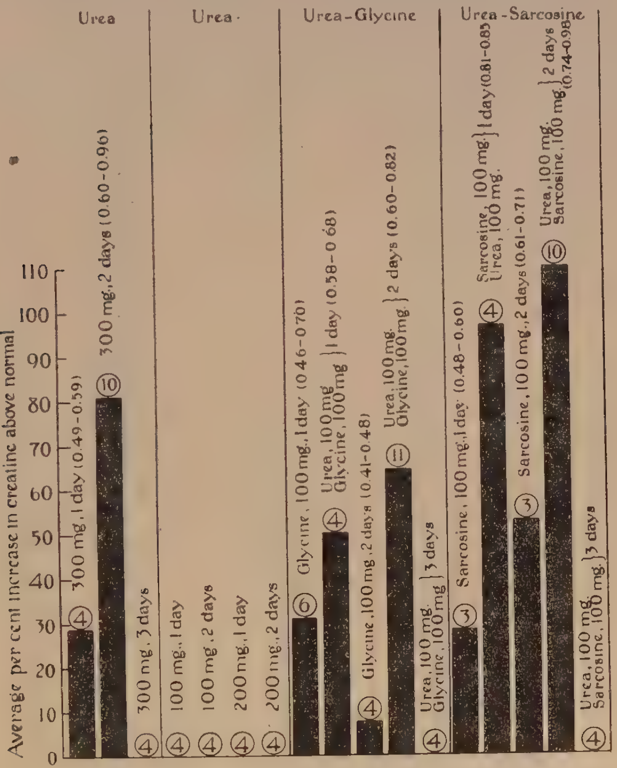
So far we have accounted for the effect of the methyl group and glycine on creatine formation. What is the source of the guanidine group? Methyl guanidine (15–20 mg.) gave significant increases in muscle creatine (Fig. 7). Komarov (1929) has shown the presence of this substance in muscle tissue, while Sullivan, Hess and Irreverre (1936) separated guanidine as the picrate from the urine of myopathy patients. Glycocyamine gave an increase of 28.5 per cent the second day. Weber (1934, 1936), Bodansky (1936), and Ackermann (1936) have shown that glycocyamine is a normal constituent of the urine. Shibuya (1937) observed in perfusion and autolysis experiments that the addition of glycocyamine, arginine, glycine or thyroxine to the perfusion fluid caused an increase in the total "creatinine equivalent" in the liver.

Arginine gave 38 per cent increase in creatine formation the second day (Fig. 6). Identical values for this amino acid were reported by Beard and Boggess (1936). Since this amino acid gives rise to urea and ornithine in metabolism, and both of these substances increase creatine formation (Figs. 3 and 8), arginine must be considered as one of the important precursors of creatine in the body. There are three possible ways in which this amino acid may be transformed into creatine: (a) the guanidine group of arginine (if excess of this amino acid be present in the tissues) could be transformed into glycocyamine and creatine according to the scheme suggested by Knoop and Neubauer and published by Tripoli and Beard (1934); (b) the urea formed from arginine could combine with glycine to form creatine (see below); or, (c) the ornithine formed under these conditions could furnish 2 amino groups, which with urea and glycine, would form creatine according to (b).

Takahashi and Kumon (1935) showed that, in the animal body, creatine is formed from the methylation of arginine or from α-amino β-hydroxybutyric acid. Edlbacher and Röthler (1925) stated that part of ingested arginine may escape the action of liver arginase and be converted to creatine. Hongo (1935) reported the transformation of arginine into creatine in the gastric mucosa of dogs. Fisher and Wilhelmi (1937) reported that, in the isolated male rabbit heart, when arginine was added to the perfusion fluid there was a quantitative transformation of this amino acid into creatine. Sekine (1928) reported that the administration of arginine, or of proteins containing arginine, was followed by an increased creatine output in the urine. Palladin and Rashba (1937) suggested that creatine may be formed from arginine in embryo tissues of vertebrates. Felix and Müller (1936) reported that argininic acid caused an increase in creatine excretion in dogs, rabbits and in patients suffering from muscular dystrophy or myasthenia gravis. *The large amount of evidence at the present time for glycocyamine and arginine as precursors of creatine is also conclusive.*

Terroine, Bonnet and Mourot (1936) showed that increased protein catabolism is the primary cause of creatinuria and that a secondary condition causes the formation of creatine from

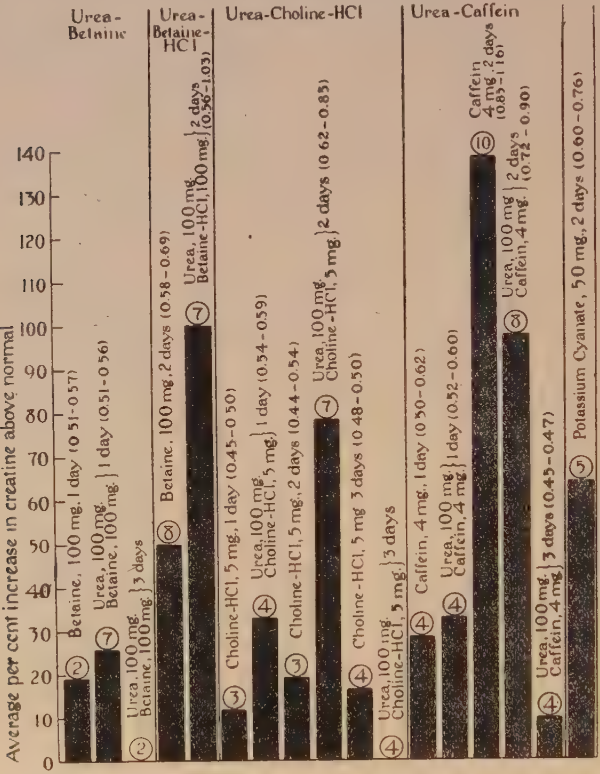
Fig. 8.
Urea summation studies in creatine formation and storage.



protein wastes which would normally be excreted in other forms. Terroine and Danmanville (1929) and Pariset (1933) showed that creatine was formed from tissue proteins. Mourot (1937) *showed in both young and old rats that all the amino acids, and especially arginine, histidine and glycine, caused a rise in creatine excretion,* while the creatinine excretion was unaffected. Terroine (1937) showed that creatine N excretion is associated with a modification in protein metabolism whereby substances ordinarily yielding urea are converted to creatine, and that the increase in creatinuria is strictly proportional to the rise in N excretion.

The eighth point of interest is shown in the results of the urea

Fig. 9.
Urea summation studies in creatine formation and storage.
Creatine formation from potassium cyanate.



experiments (Fig. 8). It required 300 mg. of urea to give increases in creatine formation. This result was definite, convincing and reproducible, and shows the great importance of the size of the dose injected upon creatine formation. If extra urea is retained in the body for a day or so, increased creatine formation occurs. These results indicate that urea is no longer to be regarded solely as a waste product of metabolism. Its participation in creatine formation serves a very useful function in the body.

The ninth and chief point of interest is the discovery of the mechanism of the synthetic formation of the guanidine group.

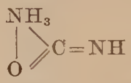
When 100 mg. of urea, which gave no increase in creatine, was injected with 100 mg. of other substances (glycine, sarcosine, choline or betaine), increases up to 67 per cent in muscle creatine were obtained above that which occurred when identical doses of these substances alone were injected. (Figs. 8 and 9). Since 4 mg. of caffein alone gave over 100 per cent increase in muscle creatine, the effect of injecting it with urea gave no greater increase than injecting caffein alone. Riesser (1913) suggested, but offered no experimental proof, that choline or betaine could be condensed with urea to form creatine. Since our manuscript was written, Thomas and Akao (1937) working with α-guanidine glutaric acid, stated that three reactions were to be considered in the formation of creatine in the animal body, i.e., the formation of the acetic acid framework, synthesis of the guanidine group, and methylation. The possibility of the condensation of glycine and urea in glycocyamine and creatine formation was suggested by Kayser (1934). Sasaki's (1930) work shows that it is possible to synthesize glycocyamidine by heating urea and glycine with glycerol in a closed tube. He also suggested that the formation of creatine and creatinine in the human body may occur from the synthesis of glycocyamine or glycocyamidine from urea and glycine.

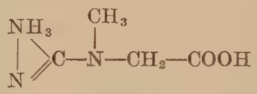
We believe that the results of the above experiments offer conclusive evidence that urea formed in the tissues, above that which could be excreted per unit of time, can furnish the guanidine group (with the amino and methyl groups from glycine or other amino acids, methylated purines, etc.) necessary for creatine formation. Since most of the amino acids can also form urea and ammonia we have here another explanation of how most of them can increase creatine formation.

As a result of our studies on the origin of creatine, together with much experimental evidence from the literature, we suggest the following scheme for creatine formation in the body from its precursors. During starvation, glycine and urea are formed synthetically in the body. Their condensation results in the formation of glycocyamine, which, upon methylation, increases the formation of *endogenous* creatine. All of these products occur normally in the body. According to Rose (1935), synthetic arginine could also furnish the guanidine group necessary for creatine formation (cf. Brand and co-workers (1933). Increasing the intake of any of the following substances, or increasing the intensity of the following processes, results in an increased formation of *exogenous* creatine, namely: glycine, urea, cyanate (Werner, (1923)) or any substance that can be transformed into them in the body (such as methyl amine or other amino acids), or any substance that can be transformed into the guanidine group (mehtyl guanidine, arginine, glycocyamine, etc.), or any substance that increases the methylation process in the body. In accordance with these views we suggest the following reaction for creatine formation in the body:¹⁾, ²⁾

Some recent work in our laboratory shows that creatine may also originate from creatinine in the body. The analogous reaction

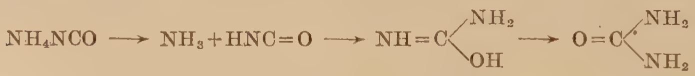
---

1) Using Werner's formula (1923) for urea  $\overset{NH_3}{\underset{O}{|}}\!>C=NH$ would probably result in the formation of creatine of the structure suggested by Plimmer (1925):



$$\overset{NH_3}{\underset{N}{|}}\!>C-\overset{CH_3}{\overset{|}{N}}-CH_2-COOH$$

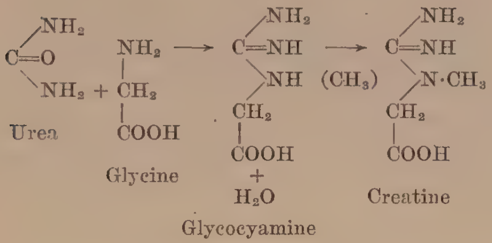
2) The amino group of an amino acid is necessary for creatine formation. This group could replace the $=C=0$ group of urea, hydantoin or hydantoic acid in metabolism with subsequent creatine formation. Guanidine itself is imido-urea and yields urea when treated with barium hydroxide (1928). The above reaction is also analogous to that of Chattaway (1912) to explain Wohler's synthesis of urea from ammonium cyanate:



$$NH_4NCO \longrightarrow NH_3+HNC=O \longrightarrow NH=C\begin{matrix}\diagup NH_2\\ \diagdown OH\end{matrix} \longrightarrow O=C\begin{matrix}\diagup NH_2\\ \diagdown NH_2\end{matrix}$$

Isourea (Werner) (Urea)

and to that of Krebs and Henseleit (1932) for urea formation in the body: ornithin + NH_3 + CO_2→citrullin→arginine→ornithine + urea. In these reaction the $=C=0$ group possesses the well known tendency to add ammonia, as in aldehyde-ammonia formation. Werner (1923) also lists 9 instances of the remarkable chemical analogy of the oxygen atom and the imino group (NH), e.g., CO and C(NH); CO_2 and O=C(NH) etc.



in this case would be as follows: Urea + glycine → glycocyamidine → creatinine → creatine. The possibility of this reaction taking place in the body has also been suggested by Sasaki (1930).

It is also possible that cyanic acid, as its Na or K salt, would react with glycine to form hydantoic acid before the formation of glycocyamine in this reaction (cf. reaction 3 below). Somewhat the same view of creatine formation from glycine and urea or glycine and cyanic acid has been expressed by Brand and Harris (1931).

Analogous reactions for creatine formation in the body as shown by the results of the present study would be:

2. Urea + sarcosine → creatine*
3. Cyanic acid + glycine → hydantoic acid + NH_3 → glycocyamine → creatine
4. Cyanic acid + sarcosine → methyl hydantoic acid + NH_3 → creatine
5. Urea + methyl amine → methylguanidine + glycine → creatine.

A review of the literature shows 32 cases where the above 5 reactions have been carried out *in vitro*.

---

* In some *in vitro* experiments in this laboratory Miss Espenan obtains a much more intense Jaffe reaction with alkaline picrate after urea and sacrosine are incubated together in water solution at 37°C than she does with urea and glycine under similar conditions. This may indicate the possibility that in the body exogenous glycine is first methylated to sarcosine which then condenses with urea to form creatine. Since this manuscript was first written much additional evidence has been obtained in eight studies confirming the results reported herewith, especially in regard to the urea-glycine reaction and to the mechanism of the methylation process in creatine formation and excretion.

SUMMARY AND CONCLUSIONS.

Forty-seven different amino acids and related substances were injected intraperitoneally, alone and in various combinations in physiological saline, into 596 experimental rats in 145 experiments. The average per cent increase in muscle creatine above the average muscle creatine of 132 control animals fed on the stock diet alone was observed. The results were as follows:

1. Butyric, nucleic and caproic acids, methyl caproate, *dl*-isoleucine, sodium pyruvate, sodium lactate, *dl*-phenylalanine, *dl*-valine, glucose, proline and hydroxy-proline, and 100 and 200 mg. urea gave no increase in muscle creatine above normal.

2. Injection of optimum doses of the following substances for 1 and 2 days gave increases up to 138 per cent in muscle creatine; aspartic acid, *dl*-*α*-amino butyric acid, *dl*-*α*-amino-methyl-butyric acid, *dl*-*α*-amino-caproic acid, *dl*-*α*-amino-valeric acid, cystine-HCl, cysteine-HCl, *d*-glutamic acid, hydantoin, glutathione, *l*-leucine, *dl*-lysine, ornithine, *l*-phenylalanine, *l*-tryptophane, di-iodo-tyrosine, *l*-valine, glycine, glycine anhydride, glycyl-glycine, di-glycyl-glycine, *l*-leucyl-glycine, *l*-leucyl-glycyl-glycine, sarcosine, sarcosine anhydride, betaine-HCl, choline-HCl, glycocyamine, arginine, caffein, *dl*-methionine, N-methyl-methionine, glycolic acid, methyl-guanidine-HCl, methyl-amine-HCl, potassium cyanate and urea (300 mg.).

3. The injection of 100 mg. urea (which gave no increase in muscle creatine) with 100 mg. of glycine, sarcosine or betaine, or with 5 mg. choline, gave average increases in muscle creatine up to 67 per cent above that obtained for these doses of the substances alone.

4. The presence of the amino group of the amino acid is necessary for creatine formation.

5. It was suggested that the amino acids are metabolized through glycine and urea as intermediates in creatine formation. No other intermediates (glucose, lactic or pyruvic acids) gave increases in creatine formation above normal.

6. Urea is no longer to be considered only as a waste product

of protein metabolism. Its participation in the synthesis of creatine serves a very useful purpose in the body.

7. Conclusive evidence was obtained that urea can be transformed into the guanidine group and with the assistance of glycine or other amino acids forms glycocyamine, which can then be methylated to creatine. These findings indicate that the guanidine group of creatine is synthetic in origin and this fact explains both the endogenous and exogenous formation of creatine in the body. Reactions illustrating these changes were discussed.

8. Stimulating or increasing the methylation process in the body increases creatine formation.

9. Maximum increases were observed 48 hours after injection of the various substances. At the end of 72 hours all of this extra creatine had disappeared showing that the storage capacity of the muscles for these large quantities of it is of very short duration.

10. A toxic reaction in the body reduces creatine formation.

11. The Jaffe reaction with alkaline picrate is *specific* for creatinine in muscle filtrates and urine in the caffein studies when the colors are matched within 12 minutes after adding the alkali.

12. Creatine formation is not necessarily limited to the physiological requirements of the organism for it, since many different substances when injected can greatly increase its concentration above normal in the muscles and its excretion in the urine. This makes creatine a catabolic substance and its production in the body is largely determined by the intake of any of its exogenous precursors.

13. The results of experiments with the methylated purines for 8–12 days showed that large increases in muscle creatine and enormous increases in creatine excretion did not increase the excretion of preformed creatinine. This points to a lack of relation between these two substances in metabolism.

14. The recent literature of creatine formation, in relation to the above results, was discussed.

We wish to thank Professors Howard B. Lewis and Vincent du Vigneaud for the samples of *l*-phenylalanine and N-methyl methionine used and Doctor Dubos for a sample of his specific creatinine enzyme. Grateful acknowledgment is also made of a grant received from the Ella Sachs Plotz Foundation for the studies reported in this paper.

APPENDIX.

Since this manuscript was written three more interesting papers have appeared. Degan (Bull. Soc. Chim. biol. **19**, 1325, 1937) showed that leucine, and to a smaller extent alanine, increases the urinary excretion of the creatines. Gradinesco and Degan (Comp. rend. soc. biol. **124**, 78, 1937) observed that, after adding leucyl-glycine to a creatine free diet of dogs, in some cases there was an increased formation of creatinine from the peptide. Davenport, Fisher and Wilhelmi (Biochem. J. **32**, 268, 1938) observed the conversion of arginine to creatine in the isolated perfused rabbit heart through glycocyamine as an intermediate. Glycollic acid was the methylative agent in this case.

BIBLIOGRAPHY.

Ackermann, D. (1936): Z. physiol. Chem., **239**, 231.
Beard, H. H. and Barnes, B. O. (1931–32): J. Biol. Chem., **94**, 49.
Beard, H. H. and Boggess, T. S. (1935): Am. J. Physiol., **113**, 647.
Beard, H. H. and Boggess, T. S. (1936): J. Biol. Chem., **114**, 771.
Beard, H. H., Tripoli, C. J. and Andes, J. E. (1934): Am. J. Med. Sci., **188**, 706.
Benedict, S. R. and Behre, J. A. (1936): J. Biol. Chem., **114**, 515.
Bodansky, M. (1936): J. Biol. Chem., **115**, 641.
Brand, E. and Harris, M. M. (1931): J. Biol. Chem., **92**, lix.
Brand, E. and Harris, M. M. (1933): Science, **77**, 589.
Challenger, F. (1936): Chem. and Ind., **55**, 900.
Chattaway, F. D. (1912): J. Chem. Soc., **101**, 170.
Del Guerra, G. (1934): Sperimentale, **88**, 823.
Edlbacher, S. (1937): Ann. Rev. Biochem., **6**, 269.
Edlbacher, S. and Rothler, A. (1925): Z. physiol. Chem., **148**, 273.
Felix, K. and Müller, H. (1936): Z. physiol. Chem., **240**, 1.
Fisher, R. B. and Wilhelmi, A. F. (1937): Biochem. J., **31**, 1136.
Hongo, Y. (1935): J. Biochem. (Japan), **21**, 279, 289.
Hunter, A. (1928): Longmans, Green and Co.
Kappeller-Adler, R. and Toda, K. (1932): Biochem. Z., **248**, 403.
Kayser, F. (1934): Actualités Scientifiques, No. 178, Herman, Paris, 54.
Kayser, F. (1934): Actualités Scientifiques et Indistrielles, No. 179,

Hermann, Paris, 24.

Kohn, R. (1931): Z. physiol. Chem., **200**, 191.

Komarov, S. A. (1929): Biochem. Z., **211**, 326.

Krebs, H. A. and Henseleit, K. (1932): Z. physiol. Che., **210**, 33.

Loffer, H. (1935): Z. physiol. Chem., **232**, 259.

Masayama, T. and Riesser, O. (1931): Biochem. Z., **234**, 323.

Milhorat, A. T. and Toscani, V. (1936): J. Biol. Chem., **114**, 461.

Miller, B. F. and Dubos, R. (1936): Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **35**, 335.

Miller, B. F. and Dubos, R. (1937): J. Biol. Chem., **121**, 457.

Mitchell, H. H. and Hamilton, T. S. (1929): A. C. S. Monograph No. 48, P. 328.

Mourot, G. (1937): Bull. soc. chem. biol., **19**, 1209.

Müller, R. (1936): Arch. exp. Path. Pharmakol., **181**, 241.

Myers, V. C. (1932): Yale J. Biol. and Med., **4**, 467.

Palladin, A. V. and Rashba, E. Y. (1937): Ukrain, Bioch. Zhur., **10**, 193.

Pariset, G. (1933): Comp. rend. acad. Sci., **197**, 704.

Plimmer, R. (1925): J. Chem. Soc., **127**, 2651.

Riesser, O. (1913): Z. physiol. Chem., **86**, 415.

Rose, W. C. (1933): Ann. Rev. Biochem., **2**, 187.

Rose, W. C. (1935): Ann. Rev. Biochem., **4**, 243.

Rose, W. C., Helmer, O. M. and Chanutin, A. (1927): J. Biol. Chem., **75**, 543.

Sasaki, T. (1930): J. Chosen Med. Ass'n., **20**, 1821.

Sekine, M. (1928): Osaka Ig. Kw. Z., **27**, 349.

Shibuya, S. (1937): J. Biochem., **25**, 701.

Shteinberg, A. A. (1936): Ukrain, Biochem. Zhur., **9**, 943.

Sullivan, M. X., Hess, W. C. and Irreverre, F. (1936): J. Biol. Chem., **114**, 633.

Takahashi, I. and Kumon, T. (1935): J. Biochem. Tokyo, **22**, 9.

Terroine, E. F. (1937): Biochem. Z., **293**, 435.

Terroine, E. F., Bonnet, R. and Moirot, G. (1936): Arch. inter. physiol., **42**, 381.

Terroine, E. F. and Danmanville, P. (1929): Comp. rend. acad. Sci., **188**, 1439.

Thomas, K. and Akao, A. (1937): J. Biochem. (Japan), **25**, 339.

Thomas, K., Milhorat, A. T. and Techner, F. (1933): Z. physiol. Chem., **214**, 121.

Tripoli, C. J. and Beard, H. H. (1934): Arch. Int. Med., **53**, 436.

Tripoli, C. J., McCord, W. M. and Beard, H. H. (1934): J. Amer. Med. Assn., **103**, 1595.

Weber, C. J. (1934): Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **32**, 172.

Weber, C. J. (1936): Proc. Am. Soc. Biol. Chem., **8**, J. Biol. Chem., **114**, cvii.

Werner, E. A. (1923): Longmans, Green and Co., N. Y., p. 148.

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

A MODIFICATION OF THE ABE'S METHOD FOR THE MICRODETERMINATION OF BILE ACID.

By

SHUSABURO KAWAGUCHI.

(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University, Hukuoka, Japan. Director: Prof. K. Kodama.)

(Received for publication, July 12, 1938.)

Quite recently Y. Abe (1937) in this laboratory reported a colorimetric microdetermination of desoxycholic and cholic acid in bile under the principle that desoxycholic as well as cholic acid gives a pink colour, when heated for a short time with vanillin and concentrated phosphoric acid (89%, specific weight 1.750), while with diluted phosphoric acid (78%, specific weight 1.625) only cholic acid appears as positive. Both specific extinctions of the colours developed by the mixture of both acids and by the cholic acid only were measured by the Pulfrich-stufenphotometer using a K_V filter and the desoxycholic value was calculated from the following equation:

$$E_{desoxycholic.} = E_{mix.} - E_{cholic.}$$

According to Abe this method enables the estimation of the acid from 0.4 mg to 1.0 mg with fair accuracy. In the course of a study of some of the problem involved in this method, the author observed that the method can be extended to 0.1 mg of cholic and desoxycholic acid when the concentration of vanillin and phosphoric acid are properly chosen. In this paper the details of the method are communicated.

EXPERIMENTALS.

I. Reagents.

1. Phosphoric Acid I.

Pure phosphoric acid (Merk) is diluted with a small amount of water until its specific weight becomes 1.625 at 22°C. Its concentration is roughly 78% in weight.

2. Phosphoric Acid II.

Pure phosphoric acid (Merk), specific weight should be 1.750 at 22°C. The concentration is nearly 89% in weight.

3. Vanillin-Alcohol solution.

5 g. of pure vanillin is dissolved in 250 cc. of 96% alcohol.

II. Experiment with pure desoxycholic and cholic acid.

The sample of desoxycholic acid obtained from the Takeda Drug Co. was purified by the method of Wieland and Sorge (1916). The material thus obtained showed a melting point at 172°C (uncorr.) and the cholic acid colour reaction of Gregory and Pascoe (1929) as well as of Reinhold and Wright (1932) came out negative.

A definite amount of pure desoxycholic acid or cholic acid was weighed and dissolved in pure alcohol. An exact portion of this solution was pipetted out into a conic flask, alcohol was distilled off, and to the residue was added 0.4 cc. of vanillin-alcoholic solution. The alcohol was distilled off carefully. Then 2.5 cc. of phosphoric acid II (89%) was added. After well mixed the flask was put in a water bath kept at 70°C for 8 minutes. The colour developed was measured by the Pulfrich-stufenphotometer using a L_{II} filter. The results are summarised in Tables I–II.

TABLE I.
Desoxycholic acid.

Phosphoric acid II, (89%). Temp. 70°C.
Heating interval: 8′minutes.

Desoxycholic acid mg.	Reading of the drum	Specific extinction (E_{II} desoxycholic)	Specific extinction per 0.1 mg.
0.6	25.4	0.595	0.099
0.4	40.2	0.396	0.099
0.2	63.5	0.197	0.0985
0.1	80.0	0.097	0.097
		mean	0.0984

TABLE II.
Cholic acid.

Phosphoric acid II, (89%). Temp. 70°C.
Heating interval: 8 minutes.

Cholic acid mg.	Reading of the drum	Specific extinction (E_{II} cholic)	Specific extinction per 0.1 mg.
0.6	11.4	0.943	0.157
0.4	23.5	0·633	0.158
0.2	48.5	0.314	0.157
0.1	69.0	0.161	0.161
		mean	0.158

Similar experiments were carried out with cholic acid with dilute phosphoric acid I (78%), warming in a water bath kept at 50°C for 10 minutes. The results are summarised in Table III.

TABLE III.
Cholic acid.

Phosphoric acid I, (78%). Temp. 50°C.
Heating interval: 10 minutes.

Cholic acid mg.	Reading of the drum	Specific extinction (E_{I} cholic)	Specific extinction per 0.1 mg.
0.6	17.4	0.760	0.127
0.4	31.1	0.504	0.126
0.2	55.7	0.254	0.127
0.1	75.0	0.125	0.125
		mean	0.126

From these tables we can see that in the range of the concentration of the author's experiment for unit concentration of both acids, the specific extinction is nearly constant, namely for 0.1 mg desoxycholic 0.0984 and for 0.1 mg cholic acid 0.158 when phosphoric aicd II is used and 0.126 in the case of phosphoric acid I.

Under the strict experimental conditions as mentioned above, the amount of both acids can be calculated as follows:

The amount of desoxycholic acid in mg. $=0.1\times\frac{E_{II\,\mathrm{desoxycholic}}}{0.0984}$

The amount of cholic acid in mg. $=0.1\times\frac{E_{II\,\mathrm{cholic}}}{0.158}$

The calculation of desoxycholic acid in the presence of cholic acid, such as in bile, can be done from the next equation as described in the introduction.

$$E_{II\,\mathrm{desoxycholic}}=E_{II\,\mathrm{mix}}-E_{II\,\mathrm{cholic}}$$

In this case E_{II} means the specific extinction measured with phosphoric acid II. But E_{cholic} can not be determined directly in the presence of desoxycholic acid. But we can get this value by multiplying $E_{I\,\mathrm{cholic}}$ by the factor 1.253, which is the mean value of the ratio $\frac{E_{II\,\mathrm{cholic}}}{E_{I\,\mathrm{cholic}}}$. The above equation, therefore, can be written as follows:

$$E_{II\,\mathrm{desoxycholic}}=E_{II\,\mathrm{mix}}-E_{I\,\mathrm{cholic}}\times 1.253$$

Table IV shows the result of one of the typical experiments. In this experiment exactly 0.3 mg. cholic acid was taken, mixed with a certain amount of desoxycholic acid as given in this table and $E_{II\,\mathrm{mix}}$ and $E_{I\,\mathrm{cholic}}$ of this mixture were determined. From this observed value the amount of desoxycholic acid was calculated which is indicated in the seventh column. The maximal error is 1%.

TABLE IV.

Cholic acid : Desoxycholic acid	Reading	$E_{II\,\mathrm{mix}}$	$E_{I\,\mathrm{cholic}}$	$E_{II\,\mathrm{cholic}}$ ($E_{I\,\mathrm{cholic}}\times 1{,}253$)	$E_{II\,\mathrm{desoxycholic}}$ ($E_{II\,\mathrm{mix}}-E_{II\,\mathrm{cholic}}$)	$0.1\times\frac{E_{II\,\mathrm{desoxycholic}}}{0.0984}$	Error %
0.3:0.3	16.8	0.775	0.380	0.476	0.299	0.303	+1
0.3:0.2	21.2	0.674	0.380	0.476	0.198	0.201	+0.5
0.3:0.1	26.7	0.574	0.380	0.476	0.098	0.099	−1

When the quantity of cholic and desoxycholic acid is larger than 0.6 mg., the colour appears so intense that the result becomes inaccurate. In such a case the sample of the acids should be diluted so as to contain an amount between 0.1 mg. and 0.6 mg.

SUMMARY.

A modification of the Abe's micro-method for quantitative determination of cholic and desoxycholic acid has been described. By this method one can determine so small an amount as 0.1 mg. of cholic and desoxycholic acid, within 1% error.

(The author is greatly indebted to Prof. K. Kodama and Prof. H. Akaiwa for their kind suggestions and criticisms throughout this research.)

REFERENCES.

Abe, Y. (1937): J. of Biochemistry, **25**, 181.
Gregory, R. and Pascoe, T. A. (1929): Jl. Biol. Chem., **83**, 35.
Reinhold, J. G. and Wright, W. D. (1932): Jl. Biol. Chem., **96**, 637.
Wieland, H. and Sorge, H. (1916): Z. Physiol. Chem., **97**, 1.

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

ON THE ACTION OF ARGINASE IN THE ORGANISM.

III. Report.

Clinical investigation on the blood arginase.*

By

HIROYUKI TAKEHARA.

(From the Medical Clinic of Prof. N. Kageura, Nagasaki Medical College, Japan.)

(Received for publication, August 5, 1938.)

In 1927 Edlbacher and his co-workers have shown that arginase, which was first found in dogs' liver by Kossel and Dakin (1904), occurs also in the human blood and is hindered by the blood serum. In the same year Edlbacher and his co-workers further found that all malignant human tumours, whether carcinomas or sarcomas, are distinguished from normal tissue by their arginase contents. And also Klein and Ziesse (1932) found that the arginase contents in malignant tumours is more than in normal tissue. Haddow and Edin (1931) have called attention to this research of Edlbacher and his co-workers and attempted to ascertain whether this metabolic property is reflected in the blood. They have investigated the arginase in the whole blood of 60 cases of non-malignant and malignant diseases, and arrived at the conclusion that the maximum effect is observed in well advanced cases of malignant diseases, particularly in those exhibiting marked involvement of the lymphatic gland. On the other hand, Iwabuchi has investigated the arginase in the red corpuscles of cancer patients, but was unable to find any marked difference between healthy persons and patients. In these respects,

---

* One part of this article was reported in the thirty-fifth annual meeting of the Japanese Society of Internal Medicine (held at Kyoto, Japan, April 2–4, 1938).

I have attempted to investigate the action of arginase in the blood of healthy persons and of various sorts of patients.

METHOD.

The action of arginase on the defibrinated blood and on the blood corpuscles was investigated. In the former case 4 cc. of the defibrinated blood was employed as ferment solution. In the latter case 4 cc. defibrinated blood was centrifuged and the precipitated blood corpuscles were well washed two times with Ringer solution and diluted to the original blood volume with water. The ferment solution thus obtained was well mixed with 5 cc. water, 5 cc. glycocoll NaOH buffer solution, 2 cc. of 2.5% arginine carbonate solution, and was placed in an incubator for 7 hours. The later procedure was made according to the method described in the first report. But in this case the arginase value is expressed by the amount of dixanthyl urea.

RESULTS.

The results of investigation on 30 healthy persons are shown in Table I. The values for arginase in the blood corpuscles ranged from 34.1 mg to 93.5 mg, the average value being 73.7 mg. The values for arginase in the defibrinated blood ranged from 33.0 mg to 86.9 mg, the average value being 64.8 mg. The difference of the arginase value between the blood corpuscles and the defibrinated blood ranged from 1.1 mg to 30.8 mg, the average value being 8.2 mg.

The results of investigation on 22 patients with jaundice are shown in Table II. The values for arginase in the blood corpuscles ranged from 39.6 mg (salvarsan jaundice) to 100.1 mg (icterus simplex), the average value being 70.6 mg. The values for arginase in the defibrinated blood ranged from 4.4 mg (salvarsan jaundice) to 95.7 mg (icterus simplex), the average value being 51.5 mg. The difference of the arginase value between the blood corpuscles and the difibrinated blood ranged from 2.0 mg (S. T. icterus simplex) to 47.3 mg (S. O. icterus simplex), the average value being 19.1 mg. This average value here obtained is over 2 times that obtained in

TABLE I.

Healthy.

No.	Name	Age	Sex	Date	Dixanthylurea (mg)		
					Defib. blood	Blood corpuscles	Difference
1	H.T.	31	♂	3/9	37.4	50.6	13.2
2	M.M.	34	♂	7/9	75.9	84.7	8.8
3	T.N.	19	♀	8/9	48.4	50.6	2.2
4	E.U.	17	♀	9/9	61.6	62.7	1.1
5	N.S.	22	♂	20/9	74.8	77.0	2.2
6	H.N.	19	♂	11/9	59.4	83.6	24.2
7	K.Y.	19	♀	14/9	68.2	70.4	2.2
8	J.T.	31	♂	17/9	61.6	67.1	5.5
9	E.K.	19	♂	20/9	46.2	77.0	30.8
10	K.I.	18	♀	20/9	67.1	71.5	4.4
11	F.T.	18	♀	22/9	57.2	68.2	11.0
12	S.A.	28	♂	25/9	33.0	34.1	1.1
13	T.H.	22	♀	28/9	69.3	81.4	12.1
14	K.N.	26	♀	29/9	62.7	72.6	9.9
15	T.H.	29	♂	30/9	77.0	90.2	13.2
16	K.I.	40	♂	4/10	58.3	74.8	16.5
17	H.Y.	18	♀	6/10	66.0	67.1	1.1
18	K.I.	20	♂	20/10	73.4	85.8	12.4
19	K.K.	20	♀	20/10	73.4	77.0	3.6
20	M.K.	18	♀	22/10	70.4	74.8	4.4
21	Y.N.	20	♀	22/10	67.1	74.8	7.1
22	S.N.	19	♀	23/10	59.4	74.8	15.4
23	M.S.	18	♀	25/10	81.4	83.6	2.2
24	M.K.	19	♀	26/10	62.4	72.6	10.2
25	K.H.	17	♀	5/11	88.5	93.5	5.0
26	M.M.	18	♀	5/11	86.9	88.0	1.1
27	Y.N.	26	♂	10/11	78.1	90.2	12.1
28	K.T.	28	♂	10/11	63.8	70.0	6.2
29	S.H.	25	♂	15/11	62.7	66.0	3.3
30	Y.K.	27	♂	15/11	73.7	77.0	3.3
Average					64.8	73.7	8.2

TABLE II.

Jaundice.

No.	Name	Age	Sex	Date	Dixanthylurea (mg)			Diagnosis
					Defib. blood	Blood corpuscles	Difference	
1	S.I.	29	♂	6/9	4.4	39.6	35.2	Salvarsan icterus
2	J.O.	25	♂	13/9	14.3	61.6	47.3	Icterus simplex Bil. 13 mg%
3	K.S.	16	♂	16/9	60.5	62.7	2.2	Icterus simplex
4	T.F.	17	♂	27/9	63.8	73.7	9.9	Icterus simplex
5	N.N.	28	♂	15/10	29.7	75.9	46.2	Icterus simplex Bil. 48 mg%
6	T.A.	23	♂	2/11	24.2	79.2	24.2	Icterus simplex
7	J.K.	24	♂	25/11	55.0	58.3	3.3	Icterus simplex Bil. 1 mg%
8	Y.S.	19	♀	6/12	29.7	59.7	30.0	Icterus simplex Bil. 18 mg%
9	K.K.	34	♂	7/12	95.7	100.1	4.4	Icterus simplex Bil. 6.4 mg%
10	I.M.	43	♂	10/12	25.3	55.0	24.7	Icterus simplex Bil. 24 mg%
11	I.O.	16	♂	16/12	59.4	75.9	16.5	Icterus simplex Bil. 9 mg%
12	K.S.	61	♂	30/1	46.2	61.6	15.4	Icterus, Concer of liver, Bil. 13 mg%
13	M.K.	19	♀	31/1	60.5	80.3	19.8	Icterus, simplex Bil. 16.5 mg%
14	Y.K.	44	♀	31/1	45.1	61.6	16.5	Icterus, syphilis of liver, Bil. 2.14 mg%
15	J.T.	22	♂	16/2	79.0	81.0	2.0	Icterus simplex Bil. 7 mg%
16	M.M.	19	♀	21/2	72.6	91.3	18.7	Icterus simplex Bil. 3.5 mg%
17	T.H.	19	♀	23/2	71.5	74.8	3.5	Icterus simplex Bil. 7.12 mg%
18	M.K.	19	♂	24/2	70.6	75.9	5.3	Icterus simplex Bil. 3.9 mg%
19	N.K.	22	♂	24/2	66.3	96.8	30.6	Icterus simplex Bil. 19 mg%
20	K.K.	41	♂	3/3	27.5	45.1	17.6	Icterus simplex Bil. 10.7 mg%
21	T.M.	22	♂	5/3	63.8	71.5	7.7	Icterus simplex Bil. 11 mg%
22	K.N.	20	♂	7/3	68.2	72.6	4.4	Icterus simplex Bil. 12.8 mg%
Average					51.5	70.6	19.1	

TABLE III.

Pulmonary Tuberculosis.

No.	Name	Age	Sex	Date	Dixanthylurea (mg)		Difference
					Defib. blood	Blood corpuscles	
1	T.M.	30	♂	29/11	60.0	67.2	7.2
2	Y.T.	21	♀	30/11	58.2	62.5	4.3
3	M.S.	24	♂	30/11	97.9	100.1	2.2
4	T.N.	28	♂	22/12	53.9	68.2	14.3
5	G.O.	30	♂	1/2	69.3	74.8	5.5
6	D.I.	28	♂	3/2	81.4	83.6	2.2
7	I.K.	25	♂	6/2	50.6	77.0	26.4
8	Y.M.	26	♀	4/3	69.3	71.5	2.2
9	M.N.	25	♀	17/12	48.4	62.7	14.3
10	G.K.	18	♂	4/2	66.0	74.8	8.8
				Average	65.5	74.2	8.7

TABLE IV.

Cancer.

No.	Name	Age	Sex	Date	Dixanthylurea (mg)			
					Defib. blood	Blood corpuscles	Difference	Diagnosis
1	I.N.	58	♂	17/10	52.8	53.8	1.0	cancer of liver
2	K.S.	61	♂	30/1	46.2	61.6	15.4	”
				Average	49.5	57.7	8.2	

healthy persons. In 13 cases, over ½ of the 22 cases of jaundice, the difference of the arginase value between the blood corpuscles and the defibrinated blood was larger than 10 mg. On the contrary, in 10 cases, ⅓ of the cases of healthy persons, the difference was larger than 10 mg. In 7 cases, about one third of the 22 cases of jaundice, the difference was larger than 20 mg. On the contrary, in only 2 cases, 1/15 of the 30 cases of healthy persons, the difference was larger than 20 mg.

The results of investigation on 10 patients of tuberculosis of the lungs and on 2 patients of cancer are shown in Table III and IV. In both cases the value for arginase in the blood corpuscles and in the defibrinated blood shows no marked difference compared with the value obtained in 30 healthy persons.

The results of investigation on patients of other various diseases are shown in Table V. The values for arginase in the blood corpuscles ranged from 40.7 mg to 96.8 mg, the average value being 74.7 mg. The values for arginase in the defibrinated blood ranged from 30.8 mg to 89.1 mg, the average value being 46.3 mg. The difference of the arginase value between the blood corpuscles and the difibrinated blood ranged from 3.3 mg (polyneuritis) to 36.3 mg (peritonitis tuberculosa), the average value being 10.8 mg. The values here obtained are nearly equal to those obtained in healthy persons.

As above stated, the arginase action in the blood corpuscles is hindered by the blood serum, and this hindering effect of the blood serum is specially strong in jaundice. With regard to this phenomenon, the question which at once arises is whether bilirubin or fellic acid, which are the main constituents of the bile, have a hindering effect on the arginase in the blood corpuscles. So I have attempted the following experiments.

The blood corpuscles obtained from 4 cc. of difibrinated blood of healthy persons were diluted to 4 cc. with water and mixed with 1 cc. of 0.08%, 0.04%, 0.02% bilirubin (each concentration of bilirubin in the mixture corresponds to 20 mg%, 10 mg%, 5 mg%) or 1 cc. of 0.04% sodium glycocholate or 0.04% sodium taurocholate (each concentration of sodium glycocholate or sodium taurocholate in the mixture corresponds to 10 mg%). The action of arginase on each mixture was investigated. The results are shown in Table VI and VII. From these tables we see that bilirubin, sodium glycocholate, sodium taurocholate have no marked influence upon the action of arginase in the blood corpuscles. Consequently on the nature of the hindering effect of the blood serum of jaundice patients further investigation is required.

In addition, I further investigated the influence of cholesterine,

TABLE V.
Various diseases.

No.	Name	Age	Sex	Date	Dixanthylurea (mg)			Diagnosis
					Defib. blood	Blood corpuscles	Difference	
1	U.H.	62	♂	1937 4/9	49.5	74.8	25.3	Syphilitic cirrhosis of liver?
2	M.T.	18	♂	22/11	63.8	74.8	11.0	Progressive paralysis
3	T.Y.	60	♂	22/11	70.4	75.9	5.5	Nephritis chronica
4	H.F.	62	♀	23/11	62.7	71.5	8.8	Diabetes mellitus
5	S.O.	54	♀	24/11	30.8	40.7	9.9	Nephritis chronica
6	S.U.	57	♀	24/11	77.0	80.3	3.3	Polyneuritis
7	T.E	40	♂	26/11	54.0	71.5	17.5	Pharyngitis chron.
8	M.M.	21	♂	29/11	40.7	77.0	36.3	Peritonitis tuberculosa
9	S.M.	39	♀	6/12	51.7	61.7	10.0	Decompensation of mitral regurgitation
10	I.A.	20	♂	7/12	53.9	66.0	12.1	Pleuroperitonitis tuberculosa
11	U.K.	20	♂	13/12	52.7	62.7	10.0	Pleuritis exsudativa sinstr.
12	H.M.	24	♂	14/12	63.9	74.8	10.9	Pleuroperitonitis tuberculosa
13	H.F.	21	♂	15/12	53.9	64.9	11.0	Beriberi
14	A.H.	67	♂	21/12	85.8	90.2	4.4	Hypertension
15	S.K.	27	♂	27/12	83.6	88.0	4.4	Pleuritis haemorrhagica
16	M.N.	45	♂	27/12	68.2	74.8	6.6	Hypertension
17	N.I.	66	♀	2/2	89.1	96.8	7.7	Diabetes mellitus
18	C.N.	59	♀	3/2	83.6	92.4	8.8	Gastric ulcer
19	K.I.	73	♀	2/3	62.7	66.0	3.3	Cholelithiasis
20	C.T.	30	♀	8/6	87.5	89.5	9.0	Pharyngitis acuta
Average					64.3	74.7	10.8	

which is a constituent of the bile, upon the action of arginase in the blood corpuscles. The blood corpuscles obtained from 4 cc. of defibrinated blood of healthy persons were diluted to 4 cc. with water mixed with 0.0072 gm. cholesterine (the concentration of the

TABLE VI.

No. of cases	Arginase in blood corpuscles	Bilirubin		
		0.08 %	0.04 %	0.02 %
1	78.1	83.6	74.8	77.0
2	55.0	56.0	53.9	53.9
3	60.4	62.0	59.0	60.0
Average	64.5	67.2	62.7	63.6

TABLE VII.

No. of cases	Arginase in the blood corpuscles	Sodium glycocholat. (0.04%)	Sodium taurocholat. (0.04%)
4	92.4	96.8	83.6
5	64.2	65.4	62.0
6	79.2	68.2	77.0
Average	78.6	76.8	73.9

TABLE VIII.

No. of cases	Arginase of the blood corpuscles	Cholesterine (0.72%)
7	71.5	71.5
8	69.3	74.8
9	68.3	72.5
Average	69.7	72.9

cholesterine in the mixture corresponds to 180 mg%). The action of arginase on the mixture was investigated. The results are shown in Table VIII. From this table we see that cholesterine has no marked influence upon the action of arginase in the blood corpuscles. Finally, I investigated the influence of human B-bile (so-called bladder bile) which was obtained by duodenal sound, because I could not obtain pure human bile, and dogs' bile, obtained from the bile bladder immediately after killing, upon the action of arginase in the human blood corpuscles.

The blood corpuscles obtained from 4 cc. of defibrinated blood of healthy persons were diluted to 4 cc. with 1 cc. of concentrated bile, 1% or 0.1% bile and with water.

The action of arginase on the mixture was investigated. The results are shown in Table IX and X. Human concentrated B-bile hindered distinctly the action of arginase in the human blood corpuscles, but diluted B-bile (1% or 0.1%) had no influence upon the action of arginase in the human blood corpuscles. Dogs' concentrated bile activated apparently the action of arginase in the human blood corpuscles, but diluted bile (1% or 0.1%) had no marked influence upon it.

TABLE IX.

No. of cases	Arginase in the blood corpuscles	B-Bile	B-Bile 1%	B-Bile 1%
10	68.2	33.0	68.2	68.2
11	59.4	30.8	57.2	58.8
12	64.5	32.0	65.0	64.8
Average	64.0	31.9	65.1	63.9

TABLE X.

No. of cases	Arginase in the blood corpuscles	Bile of dog	Bile of dog 0,1%	Bile of dog 0,1%
13	83.6	105.6	76.5	80.6
14	80.3	94.6	77.0	81.0
15	68.5	86.5	63.2	70.0
Average	77.4	95.6	72.2	77.2

DISCUSSION AND SUMMARY.

For convenience of the discussion the results of the arginase action on patients are summarized in Table XI. In all the cases the value for arginase in the defibrinated blood is smaller than that in the blood corpuscles. This result indicates that the action of arginase in the blood corpuscles is hindered by the blood serum.

TABLE XI.

Sort of diseases	No. of cases	Defib. blood	Blood corpuscles	Difference
Healthy	30	64.8	73.3	8.2
Jaundice	22	51.5	70.6	19.1
Phthisis pulm.	10	65.5	74.2	8.7
Cancer	2	49.5	57.2	8.2
The other diseases	20	64.3	74.7	10.8

This is in agreement with the result of Edlbacher and his co-workers. The hindering effect of the blood serum is much stronger in the case of jaundice than in other cases and apparently it seems to run parallel to the bilirubin contents in the blood serum. According to the Hatakeyama's investigation (1929), the 0,1%–0.3% fellic acid activate the action of arginase in the liver; on the other hand 0.35% hinder it, but 0.05% has no more influence upon it. In my experiment, 5, 10, 20 mg% bilirubin and 10 mg% fellic acid, of which a surplus is contained in the jaundice blood, have no marked influence upon the action of arginase in the blood corpuscles. So it is not the result of bilirubin or fellic acid in the jaundice serum that the hindering effect of the blood serum is specially stronger in the cases of jaundice than in other cases. I believe these are very significant facts.

180 mg% cholesterin, normal contents in the blood, also have no marked influence upon the action of arginase in the blood corpuscles. So I thought that the hindering effect of the arginase action in the jaundice serum is the result of some contents of the bile other than the previously described one, and attempted to investigate the influence of human B-bile (and dogs' bile) upon the arginase action in human blood corpuscles. Concentrated human B-bile hindered distinctly the arginase action of human blood corpuscles. It is probable that the hindering effect of the arginase action in the jaundice serum occurs by influence of some contents in the bile, but we must consider the influence of the concentration of the bile and pancreas juice in human B-bile. On the contrary, concentrated dogs' bile activated the arginase action of human blood

corpuscles, but the influence of diluted bile (1% or 0.1%) upon it was not as remarkable as that of diluted human B-bile. Namely, the concentrated B-bile of a person who has arginase action in his blood, has a contrary influence upon the arginase action in human blood corpuscles compared with the concentrated bile of dogs which have no arginase action in their blood. I suppose that the difference between the influence of dogs' bile and human B-bile upon the arginase action of human blood corpuscles comes either from the difference of the fellic acid contents (Strecker (1849), Hammersten (1926)) or from the existence of pancreas juice in the human B-bile, but other unknown factors, of course, are not excluded.

On this point further investigation is required. Finally my results are summarized as follows:

1. The value for arginase in the blood corpuscles shows relatively large individual variations.

2. The value for arginase in the blood corpuscles of patients shows no marked difference compared with that of healthy persons.

3. The arginase action in the blood corpuscles is hindered by the blood serum.

4. The hindering effect of the blood serum is specially strong in jaundice.

5. Bilirubin, sodium glycocholate, sodium taurocholate and cholesterin have no marked influence upon the action of arginase in the blood corpuscles.

6. Concentrated human B-bile which was obtained by duodenal sound hinders the arginase action in human blood corpuscles.

7. Concentrated dogs' bile activated the arginase action in human blood corpuscles.

I have to acknowledge the encouragement and guidance which Prof. N. Kageura has given me in the course of these studies, and my thanks are also due to Dr. Y. Sendju for his help and advice.

REFERENCE.

Edlbacher, Kraus, Merz (1927): Hoppe-Seylers Z., **170**, 68.
Edlbacher, Kraus, Leuthard (1933): Hoppe-Seylers Z., **217**, 89.
Haddow, Edin (1931): The Lancet, **5619**, 1022.
Hammersten (1926): Lehrb. d. physiol. Chem., **11**, 351.
Hatakeyama (1929): Arbeiten der medizinischen Universität zu Okayama, **1**, 383.
Iwabuchi (1937): J. of Biochem., **26**, 387.
Klein, Ziesse (1932): Z. Krebsforschung, **37**, 323.
Kossel u. Dakin (1904): Hoppe-Seylers Z. **41**, 321.
Strecker (1849): Ann. de. Chem., **70**. 149. Zit. nach Handb. d. Biochem. d. Mensch. u. d. Tiere. (Carl Oppenheimer) Bd. **4**. 605 (1925).

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ZUSAMMENSETZUNG DER STICKSTOFFHALTIGEN BESTANDTEILE DER CAECUMWÄNDE DES KANINCHENS UND DES HUNDES.

Von

HIROYUKI TAKEHARA.

(Aus der Medizinischen Klinik der Med. Fakultät zu Nagasaki, Japan.
Vorstand: Prof. Dr. N. Kageura.)

(Eingegangen am 15. Juni 1938)

Zwischen dem Hunde und dem Kaninchen, mit anderen Worten, zwischen dem Fleischfresser und dem Pflanzenfresser, bestehen verschiedene anatomische sowie physiologische Unterschiede in den Verdauungsorganen, deren auffälligste man im Caecum finden kann. Das Caecum des Hundes ist nämlich im Durchmesser dünn, faltenarm und kurz und die Spaltung der Cellulose spielt keine bedeutende Rolle, hingegen ist das des Kaninchens im Durchmesser dick, faltenreich und so lang, dass es den grössten Teil des Darmes bildet, und darin findet die Spaltung der Cellulose lebhaft statt (Ellenberger und Baum 1891, Mori 1935, Scheunert 1906, Sirai 1932, Winterstein 1911). Diese anatomischen und physiologischen Verschiedenheiten müssen natürlich von der Zusammensetzung der chemischen Bestandeile der Caecumwandung abhängig sein, worüber bisher keine Untersuchung vorliegt, während die anderen Teile des Verdaunngskanals in unserer Klinik schon genau untersucht sind (Ikeyama 1935, Sumida 1936, Ri). Zum Zweck des Studiums der chemischen Bestandteile der Caecumwandung untersuchte ich vor allem durch Hydrolyse die stickstoffhaltigen Bestandteile, die in den Caecumwandungen des Hundes und des Kaninchens enthalten sind.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Caecum von gesunden erwachsenen Hunden sowie von Kaninchen wurde als Material gebraucht. Dieses Material wurde mit

TABELLE I.

Material		Zahl	Gewicht d. getrockneten materials (g)	Ausgangsmaterial (g)	
				für HCl Hydrolyse	für H_2SO_4 Hydrolyse
Kaninchen	Muskelschicht	103	137	60	50
	Schleimhautschicht	109	90,5	60	30
Hund	Muskelschicht	100	112	60	50
	Schleimhautschicht	185	94	60	30

einem stumpfen Messer in Schleimhaut und Muskelschicht zerteilt und in Alkohol getaucht, bis das Material zur Untersuchung gelangte. Dann wurde das Material nochmals mit einer Schere sehr fein zerschnitten, 3 Tage in Alkoholäthermischung gehalten und dann mit einem Tuch koliert und getrocknet. Aus dem Alkoholextrakt wurde das Cholin als Cholinplatinat isoliert.

Zur Isolierung der Monoaminosäuren wurde das Material mit konz. Salzsäure hydrolysiert und nach Fischer verestert, fraktioniert, destilliert (Tabelle II) und verseift. Die einzelnen Aminosäuren wurden als Kupfersalze voneinander getrennt. Zur Isolierung der Hexonbasen wurde das Material mit Schwefelsäure hydrolysiert, nach Kossel und Kutscher bearbeitet (Tabelle III).

TABELLE II.

	Temperatur	Druck mm Hg	Gewicht (g)			
			Kaninchen		Hund	
			Schleimhautschicht	Muskelschicht	Schleimhautschicht	Muskelschicht
1. Fraktion	bis 60°C	12	0,5	0,5	1,2	2,2
2. Fraktion	60–100°C	12	1,7	1,5	6,0	4,5
3. Fraktion	100°C	0–0,2	0,4	2,0	0,6	0,7
4. Fraktion	100°–180°C	0–0,2	5,5	5,6	8,0	4,8

Tabelle III.

Material / Aminosäuren u.s.w. (g%)	Kaninchen			Hund		
	Schleimhautschicht	Muskelschicht	Durchschnitt	Schleimhautschicht	Muskelschicht	Durchschnitt
Cholin	0,33	0,80	0,57	0,28	0,27	0,27
Purin	6,83	8,40	7,61	6,70	1,40	4,05
Purin-N	0,35	0,22	0,29	0,38	0,22	0,30
Lysin	1,48	2,49	1,99	4,31	4,31	4,31
Arginin	4,56	4,78	4,64	4,53	4,44	4,49
Histidin	0,06	0,03	0,05	0,20	0,05	0,12
Tyrosin	4,00	5,85	4,92	5,10	9,65	7,37
Glutaminsäure	5,74	4,95	5,35	1,41	7,20	4,30
Glykokoll	2,03	0,43	1,23	0,77	1,51	1,14
Prolin	0,53	0,46	0,49	1,21	1,56	1,39
Alanin	0,45	0,38	0,41	1,36	2,34	1,95
Leucin	0,55	0.65	0,60	1,16	1,23	1,20
Valin	0,20	0,65	0,42	4,51	0,37	2,44
Isoleucin	0,83	0,58	0,70	0,32	0,83	0,58
Phenylalanin	5,20	1,10	3.15	2,20	0,22	1,21
Asparaginsäure	0,17	0,12	0,14	0,33	0,29	0,31
Serin	1,00	1,54	1,72	2,15	1,47	1,81

I. Hydrolyse der Muskelschicht des Hundecaecums durch Salzsäure und Trennung der Aminosäuren durch Veresterung.

60 g Trockenpräparat wurden mit 180 ccm konz. Salzsäure übergossen und im Wasserbade gelöst. Die Flüssigkeit wurde 6 Stunden am Rückflusskühler gekocht, dann mit Wasser verdünnt, abgenutscht und mit Wasser verdünnt, abgenutscht und mit Wasser gut gewaschen. Das Filtrat wurde mit Tierkohle aufgekocht, filtriert, unter vermindertem Druck stark eingeengt, in der Kälte mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und einige Tage im Eisschrank stehen gelassen. Dabei schied sich das Chlorhydrat der Glutaminsäure aus.

Diese Operation wurde wiederholt ausgeführt, bis sich keine Krystalle mehr ausschieden. Die Gesamtmenge der gewonnenen Substanz wog 5,1840 g.

0,1 g Substanz, nach Kjeldahl verbrannt, verbrauchten 5,4 ccm $n/10$-H_2SO_4.
Ber. für $C_5H_9NO_4 \cdot HCl$ 7,64% N.
Gef. 7,56% N.

Das Filtrat, welches von der Glutaminsäure befreit wurde, wurde unter vermindertem Druck zu dickem Sirup eingedampft, mit absolutem Alkohol verestert, dann mit gasförmiger Salzsäure gesättigt, und nach Impfen des Krystalls von salzsaurem Glykokollester im Eisschrank stehen gelassen, wobei Krystallisation erfolgte. Die gleiche Operation wurde wiederholt ausgeführt. Die Gesamtmenge von Glykokollesterchlorhydrat betrug 1,2090 g.

0,1 g Substanz verbrauchten 7,1 ccm $n/10$-H_2SO_4.
Ber. für $C_2H_5NO_2 \cdot HCl$ 10,03% N.
Gef. 9,94% N.

Die salzsaure, alkoholische Mutterlauge, die die Ester der übrigen Aminosäuren enthielt, wurde zu Sirup eingeengt. Die weitere Verarbeitung und die Fraktionierung der Aminoester geschah genau nach Angabe von E. Fischer. Bei der Destillation der Ester ergaben sich folgende 4 Fraktionen: (Tabelle II)

Die erste Fraktion wurde noch einmal in Esterchlorhydrate umgewandelt, wobei ganz wenige Krystalle von Glykokollesterchlorhydrat sich ausschieden. Das Filtrat wurde wieder zu Ester verarbeitet und verseift.

Die II. und III. Fraktion wurden sofort verseift. Dann wurden die drei Fraktionen zur gemeinsamen Verarbeitung vereinigt und unter vermindertem Druck vollständig bis zur Trockenheit verdampft. Die gewonnenen eingedampften Fraktionen wurden nun mit absolutem Alkohol ausgekocht, um das Prolin in Lösung zu bringen. Die Prolinlösung wurde unter vermindertem Druck bis zur Trockenheit verdampft, in Wasser aufgenommen und durch Kochen mit dem überschüssigen frisch gefällten Kupferoxyd in Kupfersalz verwandelt. Das Salz betrug 1,2610 g.

Analyse des Prolinkupfers.
0,1 g Substanz gaben 0,0257 g CuO.
Ber. für $(C_5H_8NO_2)_2$ Cu 21,79%
Gef. 22,00%

Der in Alkohol unlösliche Teil wurde mit konzentriertem

Methylalkohol erschöpfend extrahiert. Aus dem in Methylalkohol unlöslichen Teil wurden 1,7570 g Alaninkupfer und 0,9270 g Leucinkupfer getrennt gewonnen.

Analyse des Alaninkupfers.
0,1 g Substanz gaben 0,0327 g CuO.
Ber. für $(C_3H_6NO_2)_2Cu$ 26,52%
Gef. 26,62%

Analyse des Leucinkupfers.
0,1 g Substanz gaben 0,0247 g CuO.
Ber. für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$ 19,63%
Gef. 19,75%

Die methylalkoholischen Auszüge wurden von Alkohol befreit und mit Barytwasser im Autoklaven bei 180°C razemisiert und nach Entfernung des Baryts wieder in Kupfersalz verwandelt. Mittels Äthylalkohol wurde das Valinkupfersalz vom Isoleucinkupfersalz getrennt gewonnen. Das Valinkupfer wog 0,2495 und das Isoleucinkupfer 0,6665 g.

Analyse der Valinkupfers.
0,1 g Substanz lieferten 0,0275 CuO.
Ber. für $(C_5H_{10}NO_2)_2Cu$ 21,49%
Gef. 21,80%

Analyse der Isoleucinkupfers.
0,1 g Substanz lieferten 0,0248 CuO.
Ber. für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$ 19,63%
Gef. 19,79%

Die Fraktion IV wurde wie folgt behandelt, der Phenylalaninester wurde durch Ausäthern von den übrigen Aminosäureestern getrennt. Der Äther wurde abdestilliert und der Rückstand durch Abdampfen mit rauchender Salzsäure verseift. Das gewonnene salzsaure Phenylalanin wog 0,1450 g.

0,1 g Substanz verbrauchten 4,6 ccm n/10-H_2SO_4.
Ber. für $C_9H_{11}NO_2 \cdot HCl$ 6,94% N.
Gef. 6,44% N.

Die vom Phenylalaninester getrennte wässerige Lösung wurde durch Kochen mit Baryt verseift. Aus dieser Lösung schied sich nach mehreren Tagen asparaginsaures Barium krystallinisch aus. Es wurde abgenutscht, durch Schwefelsäure quantitativ von Baryt befreit und eingedampft. Dabei schied sich reine Asparaginsäure krystallinisch aus, welche 0,1780 g wog.

0,1180 g Substanz verbrauchten 7,5 ccm $n/10$ H_2SO_4.
Ber. für $C_4H_7NO_4$ 10,52% N.
Gef. 10,50% N.

Die Mutterlauge des asparaginsauren Bariums wurde mit Schwefelsäure von Baryt befreit und das Filtrat von Bariumsulfat unter vermindertem Druck stark eingeengt, mit gasförmiger Salzsäure gesättigt und im Eisschrank stehen gelassen. Dabei schieden sich Krystalle von salzsaurer Glutaminsäure aus, welche 0,3065 g wogen.

Die Mutterlauge der salzsauren Glutaminsäure wurde zur Entfernung des Chlors mit gelbem Bleioxyd gekocht und filtriert. Das Filtrat wurde mit Schwefelwasserstoff von Blei befreit. Aus dem Filtrate von Bleisulfid wurde das Serin als β-Naphthalinsulfoverbindung isoliert. Es betrug 1,0145 g.

0,1056 g Substanz verbrauchten 3,3 ccm $n/10$-H_2SO_4.
Ber. für $C_{13}H_{13}O_5NS$ 4,74% N.
Gef. 4,62% N.

II. Hydrolyse der Muskelschicht des Hundecaecums durch Schwefelsäure.

50 g Trockenmaterial wurden mit einer Mischung von 3 fachem Gewicht konz. Schwefelsäure und dem 6fachen Gewicht Wasser 14 Stunden am Rückflusskühler gekocht. Die Flüssigkeit wurde mit Baryt bis zur alkalischen Reaktion versetzt. Der Niederschlag wurde abgesaugt. Das Filtrat wurde mit Kohlensäure vom überschüssigen Baryt befreit und auf ein kleines Volumen eingeengt. Die Lösung wurde mit Schwefelsäure versetzt, bis der Prozentgehalt 5% H_2SO_4 betrug, und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Phosphorwolframsäureniederschlag wurde durch Baryt zerlegt, das unlösliche Bariumsalz abgesaugt. Das überschüssige Baryt des Filtrates wurde mit Kohlensäure befreit und eingeengt, mit verdünnter Salpetersäure schwach angesäuert und mit 20%iger Silbernitratlösung ausgefällt (Purinbasenfraktion). Das Filtrat wurde solange mit 20%iger Silbernitrat-

lösung versetzt, bis eine Probe beim Zusammenbringen mit Barytwasser braunes Silberoxyd ausfallen liess, und dann mit überschüssigem fein gepulvertem Bariumcarbonat versetzt und zunächst im Wasserbade angewärmt, dann auf dem Drahtnetz zum einmaligen Aufkochen erhitzt. Nach dem Erkalten und Absetzen wurde es filtriert. Der Niederschlag ist Histidinfraktion und das Filtrat Lysin- und Argininfraktion. Das Filtrat wurde mit Barytwasser versetzt, das dabei entstandene Silberbarytsalz von Arginin wurde abgenutscht. Der Niederschlag ist die Argininfraktion und das Filtrat ist die Lysinfraktion.

1. *Purinbasenfraktion.*

Der oben erwähnte, bei schwach salpetersaurer Reaktion durch Silbernitratlösung gefällte Niederschlag wurde nach Kjeldahl verbrannt. Der gesamte Stickstoff betrug 0,11 g.

2. *Lysinfraktion.*

Die oben erwähnte Lysinfraktionslösung wurde mit Schwefelsäure angesäuert, durch Schwefelwasserstoff vom gelösten Silber befreit und nach Einengen auf ein kleines Volumen gebracht, sodann mit einem Zusatz von soviel Schwefelsäure, dass die Lösung 5% davon enthielt, mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der Niederschlag wurde mit Baryt zerlegt und vom überschüssigen Baryt mit Kohlensäure befreit.

Der Niederschlag wurde abgesaugt und das Filtrat wurde eingeengt und mit gesättigter alkoholischer Lösung von Pikrinsäure versetzt. So schieden sich die Krystalle von Lysinpikrat aus.

Analyse des Lysinpikrates.

0,0451 g Substanz ergaben 7,8 ccm N (30,5°C und 760 mm)

Ber. für $C_6H_{14}N_2O_2 \cdot C_6H_3N_3O_7$	18,67% N.
Gef.	18,63% N.

3. *Argininfraktion.*

Das Silberbarytsalz von Arginin wurde in Wasser suspendiert, durch Schwefelsäure von Baryt, durch Schwefelwasserstoff von Silber befreit und eingeengt, dann wurde es in ganz gleicher Weise wie die Lysinfraktion behandelt. Das so gewonnene Argininpikrat betrug 4,4940 g.

Analyse des Argininpikrates.
0,0400 g Substanz ergaben 9,0 ccm N (30° C und 760 mm)
Ber. für $C_6H_{14}N_4O_2 \cdot C_6H_3N_3O_7$ 24,32% N.
Gef. 24,30% N.

4. *Histidinfraktion.*

Der oben erwähnte Histidinsilberniederschlag wurde in Wasser suspendiert, durch Schwefelsäure von Baryt, durch Schwefelwasserstoff von Silber befreit und dann filtriert, eingedampft, mit Schwefelsäure bis zu einem Gehalt von 5% versetzt und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt. Der abgesaugte Niederschlag wurde mit Baryt zerlegt und filtriert. Das Filtrat wurde durch Kohlensäure und verdünnte Schwefelsäure vom Baryt quantitativ befreit. Darauf wurde die Flüssigkeit stark eingeengt und mit gesättigter alkoholischer Lösung von Pikrolonsäure versetzt. Daraus konnte ein wenig Histidin als Pikrolonat abgeschieden werden. Es betrug 0,0720 g.

Analyse des Histidinpikrolonates.
0,0191 g Substanz ergaben 4,2 ccm N (30° C und 756,5 mm)
Ber. für $C_6H_9N_3O_2 \cdot C_{10}H_8N_4O_5$ 23,63% N.
Gef. 23,63% N.

III. Darstellung des Cholins.

Der zu Anfang erwähnte Alkoholätherextrakt wurde unter vermindertem Druck eingeengt, mit methylalkoholischer Barytlauge (5%) am Rückflusskühler eine Stunde gekocht und nach Erkalten mit Kohlensäure vom Baryt befreit. Das Filtrat wurde eingedampft und der Rückstand mit Wasser aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde wieder eingedampft, der Rückstand in Alkohol gelöst und mit alkohlischer Sublimatlösung versetzt. Der Niederschlag wurde in heissem Wasser mit Schwefelwasserstoff zersetzt; aus dem Filtrat vom Quecksilbersulfid wurde der Schwefelwasserstoff unter Durchleiten von Luft vertrieben. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeengt. Es wurde nun in Alkohol aufgenommen, filtriert, mit Wasser verdünnt und mit alkoholischer

Platinchloridlösung versetzt. So krystallisierte allmählich das Cholin als Platinchloriddoppelverbindung aus (0,2490 g).

0,1 g Substanz ergaben 0,0321 Pt.
Ber. für $(C_5H_{14}NOCl)_2 \cdot PtCl_4$ 31,69% Pt.
Gef. 32,10% Pt.

Die anderen 3 Teile wurden in ganz gleicher Weise untersucht.

Die Gesamtmenge der isolierten Substanzen ist prozentuall gegen das trockne Ausgangsamterial in folgender Tabelle zusammengestellt (Tabelle III).

ZUSAMMENFASSUNG.

In Hinsicht der quantitativen Verteilung der Proteinbausteine sind Glykokoll und Phenylalanin in der Schleimhautschicht, und Glutaminsäure, Tyrosin, Arginin und Lysin in den beiden Schichten relativ reichlich beim Kaninchen vorhanden.

Beim Hunde aber befinden sich Histidin, Valin und Phenylalanin in der Schleimhautschicht, Glutaminsäure in der Muskelschicht, und Lysin, Arginin, Tyrosin und Alanin in den beiden Schichten reichlich. Cholin, welches als Hormon für die Darmbewegung angesehen wurde, findet sich relativ reichlich in der Kaninchencaecumwandung, während des im Hundecaecum nur in halber Menge des im Kaninchencaecum befindlichen existiert.

Auch beim Experiment mit dem Appendix von Sumida (1936), ist Cholin im Kaninchenappendix sehr viel reichlicher als im Hundeappendix nachweisbar.

Lysin, Prolin, Alanin, Leucin, Valin und Tyrosin sind vorwiegend reichlicher im Hundecaecum als im Kaninchencaecum vorhanden. Aber Phenylalanin ist ziemlich reichlicher im Kaninchencaecum als im Hundecaecum enthalten.

Zum Schlusse sei es mir gestattet, Herren Proff. Drr. N. Kageura und Y. Sendju für ihre liebenswürdige Unterstützung meinen besten Dank auszudrücken.

LITERATUR.

Ellenberger, W. und Baum, H. (1891): Anatomie des Hundes 1 te Aufl. Berlin, 300.

Ikeyama, K. (1935): Journ. of Biochem., **22**, 397.

Hoppe-Seyler u. Thierfelder (1924): Handb. d. physiol. pathol. chem. Analyse. 9 te Aufl. Berlin, 561–579.

Mori, O. Tsusaki, T. u. Yoshioka, T. (1935): Zikkenyodobutsugaku 2, 1 te Aufl. Tokio, 104.

Ri, K. im Druck.

Scheunert, A. (1906): Ztschr. f. physiol. Chem., **48**, 27.

Shirai, T. u. Ando, K. (1932): Zikkendobutsunozissai 1 te Aufl. Tokio, 61.

Sumida, S. (1936): Journ. of Biochem., **23**, 147.

Winterstein, H. (1911): Handb. d. vergleich. Pathol. **2**, 1 te Aufl. Rostock, 1454.

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XXXIX. Carbohydrates in the Molecule of Osseomucoid.

By

HUMIO HISAMURA.

(*From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.*)

(Received for publication, July 18, 1938.)

In this account, the results are recorded which were obtained on osseomucoid by similar experiments as those undertaken in connection with chondromucoid (Hisamura 1938, ii). It was seen that both kinds of mucoid resemble each other closely in so far as the nature of the carbohydrate moieties is concerned, in conformity with the genetic relations of the corresponding tissues.

EXPERIMENTAL.

Preparation.

The osseomucoid used was prepared from bull femur according to Hawk and Gies with the following modification: Precipitation of the substance both from the lime water extract of tissue and from solutions of the crude products was carried out by the addition of hydrochloric acid up to pH 4.4 and the deposits were washed with 0.001% HCl (pH 6).

Extraction was repeated from the same bulk of bone shavings which yielded in three consecutive extractions 0.39, 0.13 and 0.03% of the moist material in averages of 10 runs. The specimens were combined and dried constant in vacuo at room temperature.

Fractionation of 6.8 gm. of the glycoprotein gave 0.95 gm. of Fraction a (purified) and 1.8 gm. of b (purified).

Phosphorus was not detected.

Analyses and Identification.

The details will be appended at the end of this paper. Table I shows the general analytical results.

TABLE I.

Analyses	In per cent			In equivalents per equivalent weight		
	Mucoid	Fraction a	Fraction b	Mucoid	Fraction a	Fraction b
Nitrogen	13.28	3.06	12.55			
Ash	2.22	23.56	1.71			
Sulfate-S	1.07	5.85	0.56	0.53	0.91	
Total reduction as glucose		43.53				
Carbohydrate reduction, as glucose	14.9		14.59			
Chondrosamine	11.2	26.81	7.53	1.00	1.00	1.00
Acetyl	2.75	6.35	1.96	1.02	1.00	1.08
Glucuronic acid, by furfural method	6.6	26.82	0.54	0.54	0.92	
Galactose	4.8		6.9	0.43		0.91
Non-amino sugar, as glucuronic acid		36.8			1.27	

Comment.

The data concerning the mucoid as a whole are summarized as follows: (1) less sugars and more nitrogen were involved than in the chondromucoid from tracheal cartilage of the same kind of animal (ratio: 14.9 to 22.7 and 13.28 to 12.49); (2) the true sugar present was identified as galactose; (3) the total sum of glucuronic acid and galactose approximated nearly the content of chondrosamine by equivalent weight (0.9:1.0). When it is assumed that 0.57 equivalent (the equivalent of chondrosamine minus that of galactose) of chondrosamine takes part in the formation of chondroitinsulfuric acid, the total carbohydrate reduction of the mucoid is not in good accordance with that calculated[1] from the amounts of sugars estimated individually, but it shows at least that no other sugar than the above three is present in the mucoid molecule, because the former value is less then the latter; (4) acetyl was found in an amount just corresponding to the equivalent of chondrosamine.

Analytical figures, expressed as equivalents per equivalent weight, of Fraction a were akin to the composition of chondroitinsulfuric acid. However, the glucuronic acid value obtained by the indole and orcinol method and the carbohydrate reduction exceeded the respective values calculated from the chondrosamine content. The calculated reducing force amounted to 38.18%[2] as glucose while it was in fact 43.53%. Thus the present specimen is regarded as chondroitinsulfuric acid with contaminations similarly as the preparation cited in Paper XXXVI of this series (Hisamura 1938, i).

The carbohydrate complex which is firmly linked with the protein moiety and was seen in Fraction b. of chondromucoid was found in Fraction b here (Table I, 4th and 7th columns). Sulfate-S in this fraction and furfural produced were each not more than a trace and therefore the former is deemed as an impurity and the latter as coming from the sugar constituents above mentioned. The calculated reducing force due to the complex after hydrolysis corresponds to 12.6%,[3] expressed as glucose, and was not far from the carbohydrate reduction measured experimentally.

After all, osseomucoid contains not only chondroitinsulfuric acid but also a complex which is composed of equimolecular acetylchondrosamine and galactose. The quantitative ratio of those poly-

---

1) 17.4% as glucose $=9.09(=0.112-0.048)\times 60.6\times\frac{419.5}{179})+3.89\ (=4.8\times\frac{4.98}{6.14})+4.42(=4.8\times\frac{179}{180}\times\frac{4.69}{6.14}\times\frac{216}{179})$. As to the factors for calculation, readers are referred to papers XXXIII and XXXV of this series.

2) $0.2681\times 60.6\times\frac{419.5}{179}$.

3) $7.53\times\frac{4.69}{6.14}\times\frac{216}{179}+6.9\times\frac{4.98}{6.14}$

saccharides was nearly 4 to 3,1) connected with their sugar portions.

The author is indebted to the Foundation for Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for defraying the cost of these experiments.

REFERENCES.

Hawk, P. B. and Gies, W. J. (1901): Amer. Journ. of Physiol. **5**, 387.
Hisamura, H. (1938, i): Journ. of Biochem., **28**, 141.
Hisamura, H. (1938, ii): Journ. of Biochem., **28**, 217.
Masamune, H. and Tanabe, Y. (1938): Journ. of Biochem., **28**, 1.

Analytical data:

Nitrogen

	Substance taken for analysis mg	N	
		mg	%
Mucoid	7.35	0.98	13.33
	4.08	0.54	13.23
			mean: 13.28*
Fraction a	5.0	0.1531	3.06
Fraction b	4,2728	0.5362	12.55

* Hawk and Gies: 11.72–14.44%

Ash

	S.t.f.a. mg	Ash	
		mg	%
Mucoid	22.92	0.51	2.22
Fraction a	29.7	7.0	23.56
Fraction b	23.4	0.4	1.71

Sulfate-S.

	S.t.f.a. mg	$BaSO_4$ mg	Sulfate-S	
			mg	%
Mucoid	220.59	16.97	2.33	1.06
	124.62	9.68	1.33	1.07
				mean: 1.07
Fraction a	31.0	13.2	1.8137	5.85
Fraction b	27.2	1.1	0.1511	0.56

---

1) (1.0–0.43): 0.43. 1.0 and 0.43 are the values of chondrosamine and galactose of the mucoid, expressed as equivalents.

Reducing force of hydrolysates

	S.t.f. hydrolysis mg	S. adapted to reduction assay mg	Reducing force, calc. as glucose			
			Total reduction		Carbohydrate reduction	
			mg	%	mg	%
Mucoid	14.00	0.8750			0.1303	14.9
Fraction a	0.686	0.085	0.037	43.53		
Fraction b	9.12	0.4053			0.0591	14.59

Chondrosamine

	St.f. HCl-treatment mg	S.t.f. colorimetry mg	Chondrosamine	
			mg	%
Mucoid	204.6	8.184	0.9166	11.2
Fraction a	38.0	3.04	0.8123	26.71
		4.56	1.2265	26.90
				mean: 26.81
Fraction b	60.5	7.26	0.5469	7.53

Acetyl

	S.t.f.a. mg	CH_3CO	
		mg	%
Mucoid	2.9	0.08	2.75
Fraction a	21·9	1.4061	6.42
	15.4	0.9675	6,28
			mean: 6,35
Fraction b	24.2	0.4816	1.99
	15.9	0.3053	1.92
			mean: 1,96

Glucuronic acid, by the furfural method (Händel-Tanabe)

	S.t.f.a. mg	Furfural yield mg	Glucuronic acid	
			mg	%
Mucoid	31.1	0.2987	2.0909	6.7
	30.5	0.2791	1.9537	6.4
				mean: 6.6
Fraction a	11.9	0.456	3.192	26.82
Fraction b	13.4	0.0095	0.0664	0.50
	17.6	0.0142	0.0996	0.57
				mean: 0.54

True sugar

That the true sugar in the mucoid molecule is galactose was assumed from the following figures obtained according to the second method of Masamune and Tanabe. Hydrolysis was started with 294.5 mg of the material. The amount of the mucoid adapted for colorimetry and reduction test was 0.438 mg.

Reaction	Sugar conc. in the final solution, expressed as				
	Mannose %	Galactose %	Glucose %	Arabinose* %	Xylose %
Orcinol	0.02100	0.02000	0.03025	0.01450	0.01625
Indole	0.02250	0.02025	0.01500	0.04575	0.02250
Diphenyl-amine I	0.01100	0.02200	0.01275		
Reduction	0.01746	0.02129	0.01724	0.01831	0.01703
	(mean)	0.02089			

---

* The standard curve that had been plotted previously from the coloration of an E. Merck specimen was corrected later by the use of an authentic specimen Kahlbaum.

In the case of Fraction b, 60.4 mg of the substance were dissolved in water by means of 0.1 n NaOH, neutralized with 0.1% H_2SO_4 solution, and adapted directly to colorimetry. The concentration of the solution was 0.302%.

Reaction	Sugar conc. in the solution, expressed as				
	Mannose %	Galactose %	Glucose %	Arabinose %	Xylose %
Orcinol	0.02200	0.02075	0.03150	0.01525	0.01700
Indole	0.02275	0.02075	0.01550	very deep coloration	0.03500
Diphenyl-amine I	0.01075	0.02100	0.01225		

Non-amino sugar of Fraction a.

Reaction	Conc. of solution submitted to colorimetry %	Reading mm	Non-amino sugar expressed as glucuronic acid		
			mg	%	
Indole	0.165	13.8	0.062	37.6	36.8 (mean)
	0.206	10.9	0.08	38.8	
Orcinol	0.0825	10.26	0.0295	35.8	
	0.0686	13.0	0.0235	35.1	

Identification of chondrosamine by isolating it as benzoate.

1. The product obtained from the mucoid.

Yield from 2 gm of the mucoid was 36 mg.

F. P. 200–201°C.

N-content

18.3 mg substance: 0.3679 mg N (2.01%).

Optical rotation in pyridine

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{0.227 \times 2.9421}{0.0073 \times 0.9701 \times 1} = +94^\circ.30.$$

2. The product from Fraction b.

The original material for preparation was 1.2 gm and a yield of 30 mg was obtained after purification.

F. P. 199–200°C.

N-content

12 mg substance: 0.2446 mg N (2.04%).

Optical rotation in pyridine

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{0.16 \times 2.9473}{0.0051 \times 0.9727 \times 1} = +95^\circ.06.$$

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

XL. Preparation of Mucoitin* from Umbilical Cords.

By

MASAMI SUZUKI.

(*From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University, Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.*)

(Received for publication, July 18, 1938.)

In the preparation of mucoitin from umbilical cords, two methods have been devised, one by Levene and López-Suárez and the other by Meyer and Palmer. The former authors isolated it by alkaline hydrolysis of the cords, while the latter by extraction with water after preliminary treatment of the tissue with 90% glacial acetic acid.

The writer tried to prepare the polysaccharide according to those methods, but notwithstanding that the procedures were followed as carefully as possible, none of the products obtained was found to be satisfactorily pure, and contamination by an ordinary sugar was always revealed by the Molish test. Hence, attempts were made to remove the impurities from the products obtained. The ordinary sugar appeared to be retained so tenaciously that its trace always remained, whereas nitrogenous admixtures could be removed perfectly. In this effort, however, a convenient means to isolate an authentic preparation by starting with umbilical mucin was found. The latter contains no ordinary sugar[1] and the former is split off from it merely by shaking with a chloroform-amylalcohol mixture. Furthermore, as this glycoprotein is obtained very readily and the yield is nearly quantitative, preparation of the polysaccharide in this apparently round-about way is more profitable regarding not only purity of the product but also the technique and the yield than by the heretofore elaborated methods. The preparation did not contain sulfate-S, as Palmer and Meyer claimed. Its specific rotation was —70°.9 and neutral equivalent 388.

---

* Levene and López-Suárez regarded the polysaccharide as a sulfuric acid ester, but Meyer and Palmer recently claimed it to be free from that inorganic residue and named it polyuronic acid.

[1] A communication on this subject will be published soon in this journal.

EXPERIMENTAL AND COMMENT.

Umbilical cords in each of which lie only three thick blood vessels were freed from the latter by means of a pincette. The remainder weighed 30 gm in averages per cord.

Specimen III_a was prepared direct from this material and Specimen I and III_b after drying it, by shredding, placing in 95% alcohol for 3–4 days and subjecting to an air stream. The dried powder weighed about 1/15 of the fresh material.

Analytical procedures were those employed in the previous investigations of this series.

Specimen I.

200 gm. of the dry material which corresponded to 100 umbilical cords were soaked in 2800 cc. of water, 6 liters of 7.2 per cent NaOH solution were added and the processes of Levene and López-Suárez were applied to the mixture. The product was found easily soluble in water and the addition of barium acetate was not required for its dissolution. Yield, 3 gm. Biuret was not produced. Molisch reaction gave a purple colour and not the green colour which is characteristic of uronic acid.

As is demonstrated in Table I (Column II and V), the substance was contaminated with an abundance of nitrogenous and mineral impurities. The colorations given by orcinol and indole reagents were extremely intensive, whereas furfural production coincided nearly with the glucuronic acid value calculated under the assumption that the whole aminosugar involved participated in mucosin formation. The fact as well as the sequel of Molisch reaction are suggestive of the presence of an ordinary sugar. The preparation contained, moreover, sulfate-S in the ratio of 1/5 equivalent to the aminosugar.

TABLE I.

Analyses of a mucoitin specimen prepared according to Levene and López-Suárez and those purified from it.

Analyses	In per cent			In equivalents per equivalent weight		
	Sp. I	Sp. II	Sp. VIII	Sp. I	Sp. II	Sp. VIII
Nitrogen	3.69	2.50	3.31	1.706	1.21	0.99
Ash	23.2		4.64			
Reducing force, after acid hydrolysis*, as glucose	54.0	52.5	64.04			
Glucosamine	27.65	26.5	42.75	1.00	1.00	1.00
Acetyl	7.14		10.18	1.07		0.99
Glucuronic acid, by the furfural method	28.5	29.6	48.31	0.95	1.03	1.04
Non-amino sugar, as glucuronic acid: By the indole method By the orcinol method	59.2 43.7	66.3 41.2	53.44 50.61			1.15 1.09
Sulfate-S	1.09	1.30	0.90	0.22	0.27	0.12

* The duration of heating was 3 hours.

Specimen II.

With the aim of purification, 1 gm. of Specimen I was dissolved in 100 cc. of 7.2% NaOH solution and subjected again to the whole processes adapted above. Yield of the product was 0.5 gm. Molisch's reagents, however, produced still a purple colour and analyses gave figures scarcely divergent from those of the original preparation, except that nitrogen was reduced from 1.71 to 1.21 equivalents per equivalent weight of glucosamine (Table I, Column III and VI).

Specimen III_a–VII.

Specimen III_a. 40 fresh cords which had been freed from blood vessels were subjected to the processes of Meyer and Palmer and a yield of 1.56 gm. was obtained.

Specimen III_b. 200 gm. of the material dried with alcohol were extracted with acetone in a like manner as the fresh cords were treated by Meyer and Palmer and submitted to their further processes. Yield, 5.5 gm.

Against the expectation from what the authors described, both of the preparations gave a positive biuret reaction and nitrogen amounted to as much as 7.32 and 7.71% although glucosamine took up only 27.38 and 25.3% of the respective substances. Orcinol and indole reaction demonstrated the presence of an ordinary sugar in a large quantity. They were also not free from sulfate-S (Table II, Column II and III).

As the preparations were thus found to be extremely impure, several of the usual methods were examined in an effort to effect their purification, with the following results:

1. 3 gm. of Specimen III_b were dissolved in 700 cc. of H_2O. To the solution were added 100 cc. of 4% zinc acetate solution and then 2 n. NaOH solution up to pH 7 (to phenolred) and the precipitate was centrifuged off. To the supernatant liquid was again added the volume above of the zinc acetate solution, and neutralized similarly. The supernatant liquid after centrifugalization was acidified with 110 cc. of 1 n. HCl, precipitated by means of 5 volumes of 95% alcohol and stood over night. The deposit was washed with alcohol, acetone and ether successively and dried in vacuo (*Specimen IV*). Yield, 0.9 gm.

The substance was not proved to have been materially purified according to the biuret and Molisch test and the quantitative analyses (Table II, Column IV).

2. 300 mg of Specimen IV were dissolved, acidified to pH 4.2 by addition of 1 cc. of 10% acetic acid and shaken with 1.4 gm. of kaolin for 1 hour. The mixture was centrifuged and 4 volumes of alcohol were added to the supernatant liquid. The deposit was dissolved again in 20 cc. of water, hydrochloric acid was added up to 0.2 normality and then the solution was precipitated with 10 volumes of glacial acetic acid. The deposit was washed and dried

TABLE II.

Analyses of mucoitin specimens prepared according to Meyer and Palmer and those purified from them.

Analyses	In per cent					In equivalents per equivalent weight
	Sp. III$_a$	Sp. III$_b$	Sp. IV	Sp. VI	Sp. VII	Sp. VII
Nitrogen	7.32	7.71	5.83	2.66	3.24	0.97
Ash		2.87	3.10		2.43	
Reducing force after acid hydrosis*, as glucose	52.88	45.2	52.9	57.4	65.89	
Glucosamine	27.38	25.30	29.09	27.0	42.58	1.00
Acetyl	6.92				10.81	1.06
Glucuronic acid, by the furfural method	28.00		32.8		46.40	1.01
Non-amino sugar, as glucuronic acid:						
By the indole method	65.7	50.81	52.5	72.5	51.44	1.11
By the orcinol method	48.6	44.58	50.5	52.8	49.83	1.08
Sulfate-S	0.22	0.53	0.23		—	—

* The duration of heating was 3 hours.

as above. Yield of this specimen (*Specimen V*) was 200 mg. Molisch test gave a blue colour which indicated a considerable reduction of the ordinary sugar content. Nitrogen was reduced to 4.4%. Glucosamine content was raised but still remained as low as 33.78%.

3. 700 mg of Specimen III$_a$ were taken up in 80 cc. of 7.2% NaOH and to this solution were adapted the processes of Levene and López-Suárez. The yield was 200 mg (*Specimen VI*). Biuret producing substance was removed and nitrogen was reduced to 2.66% which was 1.26 equivalent to glucosamine.

TABLE III.

Analyses of the specimen (Sp. IX) from the mucin obtained by shaking the solution of the latter with a chloroform-amylalcohol mixture.

Analyses	In per cent	In equivalents per equivalent weight
Nitrogen	3.21	0.95
Ash	1.82	
Reducing force after acid hydrolysis*, as glucose	65.67	
Glucosamine	43.16	1.00
Acetyl	10.80	1.04
Glucuronic acid, by the furfural method	46.27	0.99
Non-amino sugar, as glucuronic acid:		
By the indole method	46.05	0.98
By the orcinol method	46.68	1.00
Sulfate-S	0.0	0.0

* The duration of heating was 3 hours.

Nevertheless, Molisch test was still positive for an ordinary sugar. Quantitative analytical data are recorded in Table II, Column V.

4. 2.5 gm. of Specimen III_b were dissolved in 250 cc. of water and shaken with 65 cc. of a chloroform-amylalcohol mixture (3:1) for 15 hours. After centrifugalization, the supernatant liquid was filtered and precipitated with 10 volumes of glacial acetic acid and the deposit was washed with alcohol. The procedures were repeated over again and the substance thus obtained was washed and dried (*Specimen VII*). Yield, 70 mg. Contrary to all the products above noted, it showed neither the Molisch test for an ordinary sugar nor the biuret reaction and gave no precipitate with barium after acid hydrolysis. This preparation is regarded as a nearly pure one, because, in addition, the absolute quantities and the relationships of the components were found in accordance with the formula of mucoitin within the analytical error, although

a minute amount of an ordinary sugar was not yet removed, as is seen from the figures in Table II, Column VI and VII.

Specimen VIII.

As the chloroform-amylalcohol mixture proved to be remarkably efficient, this protein denaturing agent was applied to Specimen I, in order to see whether or not the agent is effective in reducing nitrogenous impurities of low molecular weight such as remained in this specimen and which were incapable of biuret formation.

Purification was started with 400 mg of the substance and the solution was submitted in this case to a single treatment with that organic mixed agent and 300 mg were yielded (Specimen VIII). Nitrogen was decreased to the theoretical. Molisch reaction as well as the data of estimations (Table I, Column IV and VII) resembled with those of Specimen VII, except that sulfate-S1) was not entirely eliminated. The complete removal of the ordinary sugar was not yet achieved, judging from the sequels of indole and orcinol reaction.

It appeared to be impossible to remove the final trace of the ordinary sugar. Therefore, the writer abandoned the extraction of the polysaccharide direct from tissue and resorted to an indirect method to obtain it from the mucin, after preliminary isolation of the latter from the tissue.

Specimen IX.

1.2 gm. of umbilical mucin were kneaded with a small volume of water, water was then added up to 120 cc. and twice treated with the chloroform-amylalcohol mixture as was done in the preparation of Specimen VII. Yield, 200 mg. Molisch test for ordinary sugars and biuret reaction resulted in negative. It was free from sulfate-S. The depths of coloration produced by orcinol and indole reagents, were perfectly coincident, expressed as

---

1) This sulfate-S can not be regarded as belongs to chondroitin-sulfuric acid because the tissue used for preparation had been freed entirely in advance from blood vessels.

glucuronic acid, with the figure calculated from the furfural production and demonstrated together with the remaining analyses that this preparation was an authentic one.

8 gm. of the mucin was obtainable from 100 gm. of the dry powder of the blood vessel-free cord. The yield of mucoitin above mentioned corresponds accordingly to 1.3% of the tissue powder. The yield might be raised if the preparation were started with smaller amount of the mucin without varying the volume of water for suspension and that of the chloroform-amylalcohol mixture.

Physical Properties of Specimen IX.

Optical rotation

$$[\alpha]_D^{18^\circ} = \frac{-0.45 \times 3.32634}{0.02103 \times 1.0039 \times 1} = -70^\circ.9$$

Neutral equivalent

4.80 mg. of the substance were titrated, using phenolphthalein as an indicator. The quantity of 0.01 n NaOH used was 1.26 cc.

Found:	381
(on ash free basis:	388)
Calc. for $C_{28}H_{44}O_{23}N_2$:	388

The expenses of this work were defrayed by a grant from the Foundation for the Promotion of Scientific and Industrial Research of Japan for which the writer wishes to express his gratitude.

REFERENCES.

Levene P. A. and López-Suárez, J. (1918): Journ. of Biol. Chem., **36**, 105.

Meyer K. and Palmer, J. W. (1936): Journ. of Biol. Chem., **114**, 689.

The Journal of Biochemistry, Vol. 28, No. 3.

ON DETOXICATION OF NAPHTHALENE INGESTED, WITH SPECIAL REFERENCE TO A NEW URONIC ACID EXCRETED.

SECOND REPORT.[1]

By

SUMIO UMEZAWA.

(From the Chemical Department of Hokkaido Imperial University, Sapporo.)

AND

HAJIME MASAMUNE.

(From the Medico-Chemical Institute of Hokkaido Imperial University, Sapporo.)

(Received for publication, July 18, 1938.)

In a previous work, one of us isolated a new conjugated uronic acid from urine after ingestion of naphthalene to rabbits and regarded it to be α-naphthol penturonic acid hydrate on the basis of some experimental data. The present investigation was undertaken with the aim to identify the kind of the alleged penturonic acid. Contrary to expectation, however, oxydation with following acetylation derived from the uronic acid diacetyl-*d*-saccharid acid dilactone and treatment with *p*-bromphenylhydrazin produced glucuronic acid osazone. The uronic acid was accordingly revealed to be but the ordinary glucuronic acid.

The conjugated acid is quite unstable against heat and is cleft up readily at 100°C into its components. For this reason, the elemental analysis was made formerly on a specimen dried constant at 65°C. The figures thus obtained agreed with the theoretical of naphthol penturonic acid hydrate ($C_{15}H_{16}O_7+H_2O$), but they are seen to be in good accord, as well, with those of naphthol hexuronic acid ($C_{16}H_{16}O_7 + 1\frac{1}{2}\ H_2O$) as given below:

---

[1] XLI Communication of Biochemical Studies on Carbohydrates. Read at the 60th Annual Meeting of the Chemical Society of Japan (Kyoto, April 5–6, 1938).

	C	H
Found:	55.11	5.93
Calc. for $C_{15}H_{16}O_7 + H_2O$ (I):	55.21	5.52
„ „ $C_{16}H_{16}O_7 + 1\frac{1}{2}\ H_2O$ (II):	55.33	5.52

We succeeded recently in eliminating water, without decomposition of the substance, from the specimen which had been dried once at 65°C by heating it again at 85–90°C in vacuo for 5–7 hours. The loss of weight amounted to 7.78% which corresponded exactly to the water content according to the second formula above.

That the levorotatory α-naphtholglucuronic acid (Lesnik and Nencki) which is obtainable from urine of α-naphtholized rabbits is a β-glucoside is an already established fact. The conjugated acid now in discussion is dextrorotatory as is the synthetic *l*-methyl pyranoglucuronic acid of Bergmann and Wolff. The latter compound is of α-glucoside type. The former is, therefore, thought to be also an α-isomer. The rotation of the terminal asymmetric carbon atom of glucuronic acid, which Hudson computed from the rotations of the α- and β-glucuronide of menthol, coincided fairly well with that calculated from the rotations of both forms of the glucosides with the same aglucon as the glucuronides. The fact demonstrates that *l*-methyl-β-glucuronide, which is a natural substance, is a pyranoside as are the remaining osides which are all synthetic. Later on Pryde and Williams furnished chemical evidence that the aglucon of natural borneolglucuronide is existent as a combination with glucuronic acid of pyranose form It would seem plausible to regard analogically that not only the β-glucuronide but also the new glucuronide of α-naphthol, which are both synthesized in the animal body similarly as those above mentioned, involve uronic acid also in the form of pyranse.

Hudson's calculation from α- and β-glucosides of *l*-menthol gave moreover, c_{menthyl}[1] $= 16{,}600$ as its value in alcoholic solution.

---

[1] The rotation of the menthyl radicle.

Computation[1] from the rotation of our new α-naphtholglucuronic acid, presumed as α-glucuronide, and that of α-naphthol β-glucuronide (+179.4° and −89.3° respectively in alcohol) gives 144.32 as b_{glr}, rotation of the basal glucuronic acid chain, in alcohol, and subtraction therefrom of the value b_{glr}-$c_{menthyl}$ (Hudson), calculated from the rotations of α- and β-glucuronide of *l*-menthol, leaves $c_{menthyl}=23,182$ in alcohol. This figure does not agree well with the corresponding value of Hudson. The accuracy of his rules, however, had not been thoroughly examined with respect to conjugated glucuronic acids and it might be conceivable that the dissociation as well as the lactone formation of the carboxyl group of glucuronic acid is influenced variously by different aglucons and b_{glr} is accordingly not constant. Therefore, the discrepancy to the extent seen between the two $c_{menthyl}$ values does not disprove our view as to the form of the glucuronic acid in the new uronide, namely, the occurrence of it as α-oside of pyranose form. A final conclusion will be made by synthesis of the uronide which is now being undertaken.

EXPERIMENTAL.

Cleavage of the Alleged α-Naphtholpenturonic Acid Hydrate.

1 gm. of the conjugated compound was hydrolysed, as in the previous investigation, with 20 cc. of 1 n. H_2SO_4 and the crystals of α-naphthol which came out were removed. The solution was agitated with an excess of $BaCO_3$ and filtered after standing for 3 hours. The filtrate (ca. 40 cc.) was condensed slowly in vacuo over conc. H_2SO_4. The residue which weighed 0.7 gm. was washed exhaustively with benzene in order to get rid of the remaining α-naphthol and again taken up in a small quantity of water; then the insoluble resiny part was separated on a funnel and the solution was precipitated with 3 volumes of alcohol. After redissolution and reprecipitation, the amorphous deposit was dried over $CaCl_2$ in vacuo. Its barium content was estimated as barium sul-

---

1) $(179.4° \times 320 - 89.3° \times 320)/2$.

fate gravimetrically after drying the substance constant at 90° in vacuo.

3.700 mg substance: 1.670 mg $BaSO_4$ (26.56% Ba)
Calculated for $(C_6H_9O_7)_2Ba$: 26.19% Ba
The substance reduced ammoniacal silver solution.

Lactone Formation of the Uronic Acid.

0.3 gm. of the above barium salt was taken up in a small volume of water, 1 cc. of dilute H_2SO_4 (1:10) was added and the solution was heated for a while. Barium sulfate was separated on a funnel, and the filtrate was again heated for 1 hour; then cooled and condensed in vacuo over H_2SO_4 to a small volume. Care was taken that the material did not clear by having it too long in the dessicator exposed to the excess of H_2SO_4 employed. To the concentrated solution was added an excess of absolute alcohol. A colorless crystalline meal which was precipitated thereby was washed with alcohol and dried in vacuo over H_2SO_4. The product melted, after preliminary sintering, at 166°C under gas evolution and brown coloring. It dissolved readily in water and gave neutral reaction to litmus.

Analysis of the substance, after drying constant at 80–90°C in vacuo, gave the following figures:

2.252 mg substance: 3.418 mg CO_2; 0.828 mg H_2O.
$C_6H_8O_6$. Found: C 41.39%; H 4.11%
Calc.: C 40.89%; H 4.54%.

Oxydation of the Uronic Acid with Bromine.

The barium salt of the uronic acid was dissolved in water, dilute H_2SO_4 added, and $BaSO_4$ was removed. Calcium salt was prepared from the solution by treatment with $CaCO_3$, followed by precipitation with alcohol. 0.5 gm. of this salt was then taken up in about 6 cc. of water, and, after addition of 0.2 cc. of bromine, the mixture was allowed to react slowly at room temperature. On the third day, another 0.2 cc. portion of bromine was added and the oxydation was allowed to proceed similarly for a further 3 days. Bromine was removed at first by heating on a bath, and afterwards by means of freshly prepared Ag_2O. Silver in the solution was taken off as Ag_2S with H_2S and H_2S was expelled by boiling. The solution was neutralized by agitating with an excess of $CaCO_3$ on a boiling bath, filtered, while warm, and condensed in a vacuum dessicator containing conc. H_2SO_4. Soon crystallization began to occur. The solution was left until the volume was reduced to about 20 cc. and the crystalline meal was drained, washed with water and dried over H_2SO_4 in vacuo. Yield was 0.4 gm. Analysis of the substance dried at 100–110°C in vacuo:

3.050 mg substance: 1.670 mg $CaSO_4$ (16.12% Ca).
Ca calculated for $C_6H_8O_8Ca$: 16.18%.
The product strongly reduced hot ammoniacal silver solution.

Diacetyl-d-Saccharic Acid Dilactone.

0.4 gm. of the dibasic acid salt was suspended in a small quantity of water and the calculated amount of oxalic acid in water was added. The mixture was digested, left for a while, and calcium oxalate was separated on a funnel. The filtrate was condensed in vacuo over H_2SO_4. The syrupy remainder reduced ammoniacal silver solution. As crystallization did not take place on standing for several days, it was acetylated by dissolving in an excess of acetylchloride, followed by boiling for a short time. After cooling of the solution, acetylchloride was evaporated under reduced pressure in a dessicator containing solid NaOH. The residue changed into a crystalline mass on grinding, which was then washed with alcohol and recrystallized from glacial acetic acid. Yield, 0.35 gm. The crystals were colorless and rodshaped. F. P., 188°C (with prior sintering). $[\alpha]_D^{17} = \frac{1.22\times 1.7}{1\times 0.0135} = +153.6°$ in acetone. No depression of the melting point could be detected when it was mixed with diacetyl-*d*-saccharic acid dilactone (Baltzer, Karrer). The latter specimen[1] was prepared from *d*-glucose.

p-Bromphenylosazone of the Uronic Acid.

0.7 gm. of the uronic acid barium salt was dissolved in 50 cc.

---

[1] F.P. was 188°C and $[\alpha]_D^{15} = \frac{1.22\times 1.3}{1\times 0.0104} = +152.5°$ in acetone.

of water, heated on a bath and 60 cc. of a hot solution involving 2.3 gm. of *p*-bromphenylhydrazine and 34 gm. of barium acetate were added to it. The mixture was boiled for a few minutes and filtered quickly. 3 cc. of glacial acetic acid were added to the faintly turbid and yellowish filtrate and again heated on a boiling bath until yellow crystals in the form of needles came out. They were collected on a funnel, while the solution was warm, washed with water, and then several times with boiling absolute alcohol and dried in vacuo over $CaCl_2$. 0.2 gm. was yielded. F. P., 216–217.5°C (under decomposition). The substance, after being dried at 110–120°C in vacuo, gave the following analysis:

3.626 mg substance: 0.708 mg $BaSO_4$ (11.49% Ba)
Calc. for $C_{18}H_{17}O_5N_4Br_2Ba$: 11.49% Ba.

Barium salt of *p*-bromphenylosazone of glucuronic acid prepared similarly from α-naphthol-β-glucuronide (biosynthetical substance excreted by α-naphtholized rabbits) melted at 216–217.5°C and the mixed melting point indicated the identity of both of the osazones.

Optical Rotation measured in Absolute Alcohol of the Uronide and of α-Naphthol-β-Glucuronide.

The new conjugated uronic acid:

$$[\alpha]_D^{20°} = \frac{3.04 \times 1.7}{1 \times 0.0288} = +179.4°.$$

α-naphthol-β-glucuronide:

$$[\alpha]_D^{20°} = \frac{1.76 \times 1.7}{1 \times 0.0335} = -89.3°.$$

SUMMARY.

The new conjugated uronic acid isolated from urine of naphthalenized rabbits is a kind of α-naphtholglucuronic acid. The uronic acid takes in the molecule probably the form of α-pyranose.

We wish to thank Professor H. Suginome of the Chemical Department for his kind criticism.

REFERENCES.

Baltzer, A. (1869): Ann. d. Chem., **149**, 238.

Bergmann, M. u. Wolff, W. (1923): Ber. d. Deutsch. Chem. Gesel., **56**, 1060.

Hudson, C. S. (1925): Journ. of Amer. Chem. Soc., **47**, 537.

Karrer, P. u. Smirnoff, A. P. (1922): Helv. Chim. Acta, **5**, 127.

Lesnik, M. u. v. Nencki, M. (1886): Ber. d. Deutsch. Chem. Gesel., **19**, 1534.

Masamune, H. (1934): Journ. of Biochem., **19**, 353.

Masamune, H. (1937): Journ. of Biochem., **25**, 299.

Pryde, J. and Williams, R. T. (1933): Biochem. Journ., **27**, 1197.

INDEX TO VOLUME 28.

A

Acylasewirkung, Über die ——. 199.

Akasi, Syûzo. On the nucleic acid of typhoid bacillus of mice. 355.

Albumose, Das Verhalten der Peptonkörper (——, Pepton und Trypton) gegenüber verschiedenen Enzymwirkung. 205.

Alkali-Titration, Über die Mikro-Bestimmungsmethode des Lipoidphosphors nach ——-——. 371.

Amino acid, Further observations of the effect of parenteral injection of —— ——s and related substances upon creatine formation and storage in the rat. A new theory of the origin of creatine in the animal body. 421.

Arginase, Experimental studies on the influence of various kinds of nutrition upon the action of —— in the liver, kidney and spleen. 309.

Arginase, Experimental studies on the influence of various poisons upon the action of —— in the liver, kidney and spleen. 321.

Arginase, On the action of —— in the organism. 309, 321.

Arginasewerkung, Über —— bei Kaninchen mit gestörter Leberfunktion. 405.

Ascorbinsäureoxydase, Über ——. 415.

Ascorbinsäureoxydase, Verteilung der —— in den Pflanzen. 415.

Atmungsfähigkeit und die katalytischen Eigenschaften der anaerob gezüchteten und der unter Cyanzusatz gezüchteten Hefen. 69.

B

Bacillus Coli Communis, Synthese der Chenodesoxycholsäure aus Dehydrodesoxycholsäure durch —— —— ——. 165.

Beard, Howard H. and Phillip Pizzolato. Further observations of the effect of parenteral injection of amino acids and related substances upon creatine formation and storage in the origin of creatine in the animal body. 421.

Benzaldehyd-Reaktion, Weitere Studien über die ——-—— der Desoxycholsäure. 169.

Bile acid, A modification of the Abe's method for the microdetermination of —— ——. 445.

Blood arginase, Clinical investigation on the ——. 451.

Blutgerinnung, Über den Lipoidfaktor bei der ——. 297.

Blutzuckergehalt, Über den Einfluss einiger Spaltungsprodukte aus Nucleinsäure und der Gallensäure auf den ——. 85.

Brutstadium, Über die Veränderung des Steringehalts im ——. 251.

C

Caecumwände, Untersuchungen über die Zusammensetzung der stickstoffhaltigen Bestandteile der —— des Kaninchens und des Hundes. 463.

Carbohydrate, Biochemical studies on ——s. 19, 31, 137, 141, 217, 227, 473, 479.

Carbohydrate, On the —— moiety of

chondromucoid. 217.

Carbohydrates in the molecule of osseomucoid. 473.

Chenodesoxycholsäure, Synthese der —— aus Dehydrochenodesoxycholsäure durch Bacillus Coli Communis. 165.

Cholsäure, Über das Vorkommen der —— in der Kaninchengalle. 133.

Cholsäure, Zur Bestimmung der ——. 149.

Chondroitinsulfuric acid, A critique on preparation methods of —— —— from the viewpoint of the Molisch reaction. 141.

Chondromucoid, On the carbohydrate moiety of ——. 217.

Chondrosin. 137.

Creatine, Further observations of the effect of parenteral injection of amino acids and related substances upon —— formation and storage in the rat. A new theory of the origin of —— in the animal body. 421.

Cyanzusatz, Atmungsfähigkeit und die katalytischen Eigenschaften der anaerob gezüchteten und der unter —— gezüchteten Hefen. 69.

D

Decarboxylierung, Über die katalytische —— der β-Ketosäure. 1.

Dehydrochenodesoxycholsäure, Synthese der Chenodesoxycholsäure aus —— durch Bacillus Coli Communis. 165.

Desoxycholsäure, Weitere Studien über die Benzaldehyd-Reaktion der ——. 169.

E

Ebihara, Tsutomu. Über Ascorbinsäureoxydase. I. Verteilung der Ascorbinsäureoxydase in den Pflanzen. 415.

Eisenporphyrin, Studien über die Bedeutung des ——s im Zellstoffwechsel. 69.

Enzymwirkung, Das Verhalten der Peptonkörper (Albumose, Pepton und Trypton) gegenüber verschiedenen ——. 205.

Erepsindigestat, Die fraktionierten ——e des Peptons und des Tryptons. 333.

F

Fettstoffumsatz, Untersuchung über den —— des Seidenraupenkörpers. 251.

Furfuracrylursäure, Über die Spaltung der ——. 199.

G

Gallensäure, Über den Einfluss einiger Spaltungsprodukte aus Nucleinsäure und der —— auf den Blutzuckergehalt. 85.

Gallensäure, Über die ——n der Seebärengalle. 161.

Gallenstein, Über die chemische Zusammensetzung der ——e. 265.

Gelatin, Partielle Spaltung der ——e. 51.

Gelatin, Über die Peptonkörjer der —e. 205, 333, 345.

Glycoprotein, On quantitative analysis of sugars in ——s by fractionation of their hydrolysates. 19.

N-Glycoside, Studies on ——s. 109.

Guanine- and riboguanosine-deaminase. 185.

H

Hanaoka, Kenzi. Studies on N-glycosides. I. Toluidine- and xylidine-N-glucosides. 109.

Hefe, Atmungsfähigkeit und die katalytischen Eigenschaften der anaerob gezüchteten und der unter Cyanzusatz gezüchteten ——n. 69.

HISAMURA, Humio. Biochemical studies on carbohydrates. XXXVI. A critique on preparation methods of chondroitinsulfuric acid from the viewpoint of the Molisch reaction. 141.
XXXVII. On the carbohydrate moiety of chondromucoid. 217.
XXXIX. Carbohydrates in the molecule of osseomucoid. 473.

Histozym, Studien über die Spezifität des ——s. 237.

Hund, Untersuchungen über die Zusammensetzung der stickstoffhaltigen Bestandteile der Caecumwände des Kaninchens und des ——es. 463.

Hydrolysate, On quantitative analysis of sugars in glycoproteins by fractionation of their ——s. 19.

I

ISHINO, Nobuyasu. Über das Vorkommen der Cholsäure in der Kaninchengalle. 133.

K

KAIJU, Masaru. Über Arginasewirkung bei Kaninchen mit gestörter Leberfunktion. 405.

KANEKO, Sei. Über die katalytische Decarboxylierung der β-Ketosäure. 1.

Kaninchen, Über Arginasewirkung bei —— mit gestörter Leberfunktion. 405.

Kaninchen, Untersuchungen über die Zusammensetzung der stickstoffhaltigen Bestandteile der Caecumwände des ——s und des Hundes. 463.

Kaninchengalle, Über das Vorkommen der Cholsäure in der ——. 133.

KAWAGUCHI, Shusaburo. A modification of the Abe's method for the microdetermination of bile acid. 445.

KAWASAKI, Osamu. Studies on tyrosinase. III. The effect of the addition of various salts on the potato tyrosinase. 383.

KAYASHIMA, Sinkichi. Effect of reduction and oxidation on the reversible action of liver-esterase. 175.

β-Ketosäure, Über die katalytische Decarboxylierung der --——. 1.

Kidney, Experimental studies on the influence of various poisons upon the action of arginase in the liver, —— and spleen. 321.

Kidney, Experimental studies on the influence of various kinds of nutrition upon the action of arginase in the liver, —— and spleen. 309.

KOBAYASI, Tadasi. Biochemical studies on carbohydrates. XXXIV. Polysaccharides from urine. First paper. 31.

KONUMA, Nobuo. Untersuchungen über den partiellen Abbau der Proteine. III. Mitteilung. Partielle Spaltung der Gelatine. 51.

KOYANAGI, Jokiti. Über die Mikro-Bestimmungsmethode des Lipoidphosphors nach Alkali-Titration. 371.

KUMAMOTO, Kyozaburo. Über die synthetische Wirkung des Pepsins. 95.

KUROSAWA, Tadao. Über den Lipoidfaktor bei der Blutgerinnung. 279.

L

Leberfunktion, Über Arginasewirkung bei Kaninchen mit gestörter ——. 405.

Lipoidfaktor, Über den —— bei der Blutgerinnung. 297.

Lipoidphosphor, Über die Mikro-Bestimmungsmethode des ——s nach Alkali-Titration. 371.

Liver-esterase, Effect of reduction and oxidation on the reversible action of —— ——. 175.

Liver, Experimental studies on the influence of various kinds of nutrition upon the action of arginase in the ——, kidney and spleen. 309.

Liver, Experimental studies on the influence of various poisons upon the action of arginase in the ——, kidney and spleen. 321.

M

Maeda, Kenzi. Über den Einfluss einiger Spaltungsprodukte aus Nucleinsäure und der Gallensäure auf den Blutzuckergehalt. 85.

Makino, Katashi. Über die Konstitutionsfrage des antineuritischen Vitamins. 293.

Masamune, Hajime and Humio Hisamura. Biochemical studies on carbohydrates. XXXV. Chondrosin. 137.

Masamune, Hajime and Yasuhisa Tanabe. Biochemical studies on carbohydrates. XXXIII. On quantitative analysis of sugars in glycoproteins by fractionation of their hydrolysates. 19.

Masamune, Hajime and Sumio Umezawa. On detoxication of naphthalene ingested, with special reference to a new uronic acid excreted. Second report. 487.

Mice, On the nucleic acid of typhoid bacillus of ——. 355.

Microdetermination, A modification of the Abe's method for the —— of bile acid. 445.

Mikro-Bestimmungsmethod, Über die —— - ——e des Lipoidphosphors nach Alkali-Titration. 371.

Mori, Tanenao. Über die Gallensäure der Seebärengalle. 161.

Mori, Toshio. Über die Acylase wirkung. V. Mitteilung. Über die Spaltung der Furfuracrylursäure. 199.

Mori, Toshio. Über die Peptonkörper der Gelatine. I. Mitteilung. Das Verhalten der Peptonkörper (Albumose, Pepton und Trypton) gegenüber verschiedenen Enzymwirkungen. 205.
 II. Mitteilung. Die fraktionierten Erepsindigestate des Peptons und des Tryptons. 333.
 III. Mitteilung. Das fraktionierte Pepton und Trypton. 345.

Mucin from sublingual gland. 227.

Mucoitin, Preparation of —— from umbilical cords. 479.

Murao, Shizuo. Untersuchung über den Fettstoffumsatz des Seidenraupenkörpers. Über die Veränderung des Steringehalts im Brutstadium. 251.

N

Naphthalene, On detoxication of —— ingested, with special reference to a new uronic acid excreted. 487.

Nawa, Kôtarô. Studien über die Spezifität des Histozyms. 237.

Nishimura, Masaya. Über die chemische Zusammensetzung der Gallensteine. 265.

Nucleic acid, On the —— —— of typhoid bacillus of mice. 355.
Nucleindeaminase, Studies on ——s. 185.
Nucleinsäure, Über den Einfluss einiger Spaltungsprodukte aus —— und der Gallensäure auf den Blutzuckergehalt. 85.
Nutrition, Experimental studies on the influence of various kinds of —— upon the action of arginase in the liver, kidney and spleen. 309.

O

Organism, On the action of arginase in the ——. 309, 321.
Osseomucoid, Carbohydrates in the molecule of ——. 473.
Oxidation, Effect of reduction and —— on the reversible action of liver-esterase. 175.

P

Pepsin, Über die synthetische Wirkung des ——s. 95.
Pepton, Das fraktionierte —— und Trypton. 345.
Pepton, Das Verhalten der Peptonkörper, Albumose, —— und Trypton) gegenüber verschiedenen Enzymwirkung. 205.
Pepton, Die fraktionierten Erepsindigestate des ——s und des Tryptons. 333.
Peptonkörper, Über die —— der Gelatine. 205, 333, 345.
Pflanzen, Verteilung der Ascorbinsäureoxydase in den ——. 415.
Pizzolato, Phillip and Howard H. Beard. Further observations of the effect of parenteral injection of amino acids and related substances upon creatine formation and storage in the rat. A new theory of the origin of creatine in the animal body. 421.
Poison, Experimental studies on the influence of various ——s upon the action of arginase in the liver, kidney and spleen. 321.
Polysaccharides from urine. 31.
Protein, Untersuchungen über den partiellen Abbau der ——e. 51.

R

Rat, Further observations of the effect of parenteral injection of amino acids and related substances upon creatine formation and storage in the ——. A new theory of the origin of creatine in the animal body. 421.
Reduction, Effect of —— and oxidation on the reversible action of liver-esterase. 175
Reversible action, Effect of reduction and oxidation on the —— —— of liver-esterase. 175.
Riboguanosine-deaminase, Guanine- and ——-——. 185.

S

Salt, The effect of the addition of various ——s on the potato tyrosinase. 383.
Seebärengalle, Über die Gallensäuren der ——. 161.
Seidenraupenkörper, Untersuchung über den Fettstoffumsatz des ——s. 251.
Shimada, Toshio. Weitere Studien über die Benzaldehyd-Reaktion der Desoxycholsäure. 169.
Shimada, Toshio. Zur Bestimmung

der Cholsäure. II. Mitteilung: Eine Verbesserung zur Methode von Gregory und Pascoe. 149.

SIHN, Tai Sihk. Synthese der Chenodesoxycholsäure aus Dehydrochenodesoxycholsäure durch Bacillus Coli Cammunis. 165.

Spleen, Experimental studies on the influence of various kinds of nutrition upon the action of arginase in the liver, kidney and ——. 309.

Spleen, Experimental studies on the influence of various poisons upon the action of arginase in the liver, kidney and ——. 321.

Steringehalt, Über die Veränderung des ——s im Brutstadium. 251.

Sublingual gland, Mucin from —— ——. 227.

Sugar, On quantitative analysis of ——s in glycoproteins by fractionation of their hydrolysates. 19.

Sulfatase. Über die ——. 119.

Sulfatbestimmung, Eine Mikromethode zur ——. 37.

SUZUKI, Masami. Biochemical studies on carbohydrate. XL. Preparation of mucoitin from umbilical cords. 479.

T

TAKEHARA, Hiroyuki. On the action of arginase in the organism.
I. Experimental studies on the influence of various kinds of nutrition upon the action of arginase in the liver, kidney and spleen. 309.
II. Experimental studies on the influence of various poisons upon the action of arginase in the liver, kidney and spleen. 321.
III. Clinical investigation on the blood arginase. 451.

TAKEHARA, Hiroyuki. Untersuchungen über die Zusammensetzung der stickstoffhaltigen Bestandteile der Caecumwände des Kaninchens und des Hundes. 463.

TANABE, Yasuhisa. Biochemical studies on carbohydrates. XXXVIII. Mucin from sublingual gland. First paper. 227.

TANABE, Yasuhisa and Hajime MASAMUNE. Biochemical studies on carbohydrates. XXXIII. On quantitative analysis of sugars in glycoproteins by fractionation of their hydrolysates. 19.

TANAKA, Seii. Eine Mikromethode zur Sulfatbestimmung. 37.

TANAKA, Seii. Über die Sulfatase. 119.

Toluidine- and xylidine-*N*-glucosides. 109.

Trypton, Das fraktionierte Pepton und ——. 345.

Trypton, Das Verhalten der Peptonkörper (Albumose, Pepton und ——) gegenüber verschiedenen Enzymwirkungen. 205.

Trypton, Die fraktionierten Erepsindigestate des Peptons und des ——s. 333.

Typhoid bacillus, On the nucleic acid of —— —— of mice. 355.

Tyrosinase, Studies on ——. 383.

Tyrosinase, The effect of the addition of vairous salts on the potato ——. 383.

U

Umbilical cord, Preparation of mucoitin from —— ——s. 479.

UMEZAWA, Sumio and Hajime MASAMUNE. On detoxication of naph-

thalene ingested, with special reference to a new uronic acid excreted. Second report. 487.
Urine, Polysaccharides from ——. 31.
Uronic acid, On detoxication of naphthalene ingested, with special reference to a new —— —— excreted. 487.

V

Vitamin, Über die Konstitutionsfrage des antineuritischen ——s. 293.

W

WAKABAYASI, Yosio. Studies on nucleindeaminase. I. Guanine- and riboguanosine-deaminase. 185.

X

Xylidine-*N*-glucoside, Toluidine- and —— - ——s. 109.

Y

YOSHIKAWA, Haruhisa. Studien über die Bedeutung des Eisenporphyrins im Zellstoffwechsel. II. Atmungsfähigkeit und die katalytischen Eigenschaften der anaerob gezüchteten und der unter Cyanzusatz gezüchteten Hefen. 69.

Z

Zellstoffwechsel, Studien über die Bedeutung des Eisenporphyrins im ——. 69.